Aus dem Zentralinstitut
für Anaesthesiologie und Transfusionswesen
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer

Neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung an Erythrozyten septischer Intensivpatienten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ULRIKE GOES
aus Stuttgart

1984

Aus dem Zentralinstitut
für Anaesthesiologie und Transfusionswesen
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer

Neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung an Erythrozyten septischer Intensivpatienten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ULRIKE GOES
aus Stuttgart

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Junger
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Baron

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

GLIEDERUNG

1. EINLEITUNG

2. LITERATURÜBERSICHT
2.1 Das Thomsen-Friedenreich Phänomen
2.2 Bedeutung der Neuraminidase als pathogenetischer Faktor

3. PATIENTENGUT, METHODE UND MATERIAL
3.1 Patientengut
3.2 Methode und Material
3.2.1 Nachweis eines demaskierten T-Antigens am Erythrozyten
3.2.1.1 Direkter Anti-T_{Ah} Test
3.2.1.2 Anti-T_{Ah} Test und Supplement
3.2.1.3 Indirekter Anti-T_{Ah} Test
3.2.1.4 Direkter Coombstest
3.2.1.5 Inkubation der Patientenerythrozyten mit Neuraminidase
3.3 Bestimmung der Neuraminsäure
3.4 Bestimmung der Neuraminidaseaktivität
3.5 Bestimmung des Serumhämoglobins
3.6 Blutsenkungsgeschwindigkeit mit und ohne Neuraminidase
3.7 Reagenzien und Bezugsquellen

4. ERGEBNISSE
4.1 Nachweis eines demaskierten T-Antigens am Erythrozyten
4.1.1 Optimierung des direkten Anti-T_{Ah} Tests
4.1.2 Verteilung der T-Antigendemaskierung im Patientengut
4.1.2.1 Direkter Anti-T_{Ah} Test

4.1.2.2 Indirekter Anti-T_{Ah} Test
4.1.2.3 Direkter Coombstest
4.1.2.4 Inkubation der Patientenerythrozyten mit Neuraminidase
4.2 Bestimmung der Neuraminidase und der Neuraminsäure
4.3 Bestimmung des Serumhämoglobins
4.4 Blutsenkungsgeschwindigkeit mit und ohne Neuraminidase
4.5 Demaskierte T-Antigene und bakterielle Befunde
4.6 Demaskierte T-Antigene bei verschiedenen Krankheitsbildern

5. DISKUSSION

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. TABELLEN

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Neuraminidase gewinnt als pathogenetischer Faktor von septischen Krankheitsprozessen, hämolytischen Anämien, vom hämolytisch urämischem Syndrom (HUS) und von der nekrotisierenden Enterocolitis (NEC) zunehmend an Bedeutung. Das Enzym, das von einigen Viren, Pilzen, Protozoen und einer Vielzahl von Bakterien produziert wird, spaltet N-Acetyl-Neuraminsäure von Erythrozyten - sowie anderen Zellmembranen ab. Die dadurch freigelegten Rezeptoren bzw. Membrankomponenten werden als T-Kryptantigene (Thomsen-Friedenreich Antigene) bezeichnet. Freigelegte T-Kryptantigene können mit dem im normalen menschlichen Serum vorhandenen Anti-T-Agglutinin reagieren und zur Hämolyse führen. In vitro können die auf Erythrozyten freigelegten T-Antigene mit Erdnuß-Agglutinin Anti-T_{Ah} durch positive Agglutination nachgewiesen werden.

FISCHER und POSCHMANN zeigten erstmals in klinischen und immunologischen Untersuchungen in vitro und in vivo die Bedeutung der bakteriellen Neuraminidase für die Entstehung des HUS (121).

Das HUS beginnt mit einem fieberhaften Prodromalstadium, das durch Infektionen des Respirations- bzw. Magen-Darm-Traktes hervorgerufen wird, und ist durch folgende Symptome gekennzeichnet:
Akute hämolytische Anämie
Hämorrhagische Diathese
Akutes Nierenversagen (ANV).
Neben neuraminidaseinduzierten T-Kryptantigenfreilegungen am Erythrozyten (Ursache der hämo-

lytischen Anämie) wurden beim HUS erstmals T-Antigene an Kapillarendothelien der Nierenglomeruli nachgewiesen (Ursache des akuten Nierenversagens) (36, 163). Neuraminidase ist damit die erste mikrobielle Substanz, deren Wirkung an Erythrozyten und Endothelien auf direktem Weg erfolgt (41).

Neben dem HUS wurden bisher zahlreiche septische Infektionen mit neuraminidaseinduzierten Anämien beobachtet (50,104,123,100,119,124). Ausgangsherd dieser septischen Prozesse sind am häufigsten Peritonitiden sowie pleurapulmonale Infektionen (42). Diese Infektionen wurden in den letzten Jahren in zunehmendem Maß durch Anaerobier hervorgerufen (169,170), die größtenteils zu den neuraminidasebildenden Mikroorganismen gehören. Vor allem die Gruppe der Bacteroides mit hoher Neuraminidaseaktivität zählt heute zu den wichtigsten Erregern von Wundinfektionen, schweren eitrigen Infektionen im Abdominalbereich und von anaerober Sepsis (57,82). Da Patienten chirurgischer Intensivstationen, insbesondere polytraumatisierte Patienten (27) und Patienten nach abdominalchirurgischen Eingriffen für diese Keime besonders infektanfällig sind und häufig als Komplikationen Symptome des HUS Syndroms (Infektion, Anämie, Hämorrhagische Diathese, Trombozytopenie, ANV, Sepsis) vorweisen, stellte sich für uns die Frage, ob bei chirurgischen Intensivpatienten ein Teil dieser Symptome mit einer Neuraminidasewirkung in Zusammenhang steht.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf der Intensivstation der chirurgischen Universitätsklinik Tübingen in einer Screening-Untersuchung bei allen Patienten mit dem Verdacht auf ein septisches Krankheitsbild nach einer neuraminidaseinduzierten T-Antigenfreilegung am Erythrozyten gesucht, um folgender Fragestellung nachzugehen:

Wie häufig weisen Patienten mit septischen Temperaturen bei welchen Krankheitsbildern und welchen Keimen demaskierte T-Antigene am Erythrozyten auf?

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 DAS THOMSEN-FRIEDENREICH-PHÄNOMEN

HÜBNER (1926) und THOMSEN (1927) beobachteten zum ersten Mal das Phänomen der Panagglutination menschlicher Erythrozyten (66, 153). Panagglutination bedeutet, daß menschliche Erythrozyten in ihrer Antigenstruktur so verändert werden, daß sie durch normale Seren Erwachsener agglutiniert werden. FRIEDENREICH (1930) interpretierte dieses Phänomen als eine durch Bakterien bedingte enzymatische Transformierung der Erythrozytenmembran. Er zeigte, daß diese transformierten roten Blutzellen mit einem im Serum aller Vertebraten vorhandenen Agglutinin Anti-T reagieren und damit panagglutinabel waren (Hübner-Thomsen-Friedenreich-Phänomen) (44, 45, 46, 47). Fünfzehn Jahre später beschrieb HIRST, daß Hühnererythrozyten bei Zugabe von Myxoviren durch dasselbe Enzym zur Agglutination kommen (61). Da dieses Enzym an der Erythrozytenoberfläche Rezeptoren zerstört (Virusrezeptoren, MN-Blutgruppenantigene), wurde es "receptor destroying enzyme" RDE genannt (23). KLENK und GOTTSCHALK identifizierten die Rezeptorgruppe später als N-Acetyl-Neuraminsäure und führten für das Enzym 1957 den heute gebräuchlichen Namen "Neuraminidase" ein (16, 51).

Inzwischen sind über 50 verschiedene Isoenzyme der Neuraminidase bekannt, die von zahlreichen Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen gebildet werden (103).

In der folgenden Tabelle sind alle neuraminidase-bildenden Mikroorganismen mit entsprechender Enzymaktivität zusammengestellt (103).

Tabelle 1: Neuraminidasebildende Mikroorganismen

+++ starke Neuraminidaseaktivität
++ unregelmäßige Neuraminidaseaktivität
+ schwache Neuraminidaseaktivität
? unbekannt

Mikroorganismen	Name		Enzym-aktivität
Pilze	Ceratocystis stenoceras	(105)	?
	Sphorothrix schenckii	(105)	?
Protozoen	Trichomonas fetus	(26,109)	+++
	Trypanosoma cruzi	(167)	?
Bakterien	Vibrio Cholerea	(1,23)	+++
	NAG Vibrio		+++
	Pseudomonas fluorescens	(142)	+
	stuzeri	(142)	+
	aeruginosa	(142)	+
	Pasteurella multocida	(79,96,99,127)	+++
	hämolytica	(35,80,136)	+++
	pseudotuber-culosis	(83)	+
	Bacteroides fragilis	(43,57,107,108)	+++
	distasonis	(43,108)	+++
	thetiaomicron	(43,108)	+++
	vulgatus	(43,108)	+++
	oralis	(43,108)	+++
	ovatus	(43,108)	+++
	Fusobacterium spec.	(168)	+++
	Leptotrichia innominata	(168)	+++
	Sphaerophorus varius	(168)	+++

Mikroorganismen	Name		Enzym-aktivität
Bakterien	Diplococcus pneumoniae	(72,92)	+++
	Streptococcus sanguis	(60,100)	++
	varidans	(35,100)	++
	group K	(59,100)	+++
	group A,B,C,D, E,F,G,H,L,K, N,O	(100)	++
	Lactobacillus bifidus E	(142)	+
	Corynebacterium diphteriae	(17)	+++
	belfanti	(5)	+++
	haemolyticum	(5,101)	+++
	ovis	(5)	+++
	pyogenes	(5,101)	+++
	ulcerans	(5)	+++
	acnes	(98)	+++
	Erysipelothrix insidiosa	(97)	+++
	rhusiopathiae	(81)	+
	Clostridium perfringens	(93)	+++
	septicum	(94,166)	+++
	tertium	(65)	+++
	sordellii	(166)	+++
	Klebsiella aerogenes	(114)	+
	Streptomyces albus	(110)	++
	Bifidobacterium lactentis	(112)	+
	Mycoplasma gallisepticum	(134)	++
	pneumoniae	(87)	?
Viren	Influenza A,B,C	(33,134)	?
	Parainfluenza 1,2,3	(33)	?
	Newcastle disease	(33)	?
	Mumps	(33)	?

nach MÜLLER (103,106) und DRZENIEK (33)

Die freigesetzte Neuraminidase spaltet α-ketosidisch gebundene Neuraminsäuren von Glykoproteinen (z.B. Serumglykoproteine, Mucine), Mucoiden (z.B. Mucoide der Erythrozytenoberfläche) und Glykolipiden (z.B. einige Ganglioside) ab (128). Die dadurch freigelegten Rezeptoren werden als Friedenreich-Antigene (T_F) bezeichnet und sind für jede Zellart charakteristisch (154,155). Da diese Rezeptoren durch endständige D-Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosaminstrukturen geprägt sind, lassen sie sich durch antikörperähnliche Substanzen, die gegen endständige Zuckerstrukturen gerichtet sind, besonders gut erfassen (157, 158).

Zu diesen Substanzen gehören "Lectine" aus Pflanzensamen (Phytagglutinine) und "Protectine" aus der Eiweißdrüse von Schnecken (78, 79, 85). Dies sind Glykoproteine, die wie Antikörper reagieren und nicht den Immunglobulinen angehören (141). BIRD entdeckte 1964 ein Lectin aus der Erdnuß (Arachis hypogaea), das dem natürlich vorkommenden Anti-T funktionell sehr ähnlich ist und freigelegte T_F-Antigene am Erythrozyten durch Agglutination in vitro nachweist (8).

Eine Neuraminidasewirkung in vivo kann durch die Reaktion freigelegter T-Antigene mit den im Serum natürlich vorkommenden Anti-T-Agglutininen zu hämolytischen Anämien führen.

T-Agglutinine finden sich wie die Blutgruppenantikörper Anti-A und Anti-B im Serum aller Menschen mit Ausnahme von Neugeborenen und Patienten mit Antikörpermangelsyndrom (41, 50, 84, 90, 153). Sie werden ebenso wie die Blutgruppenantikörper Anti-A und Anti-B durch Antigene auf Bakterien der intestinalen Flora induziert (22, 74, 144). T-Agglutinine gehören überwiegend der IgM-Klasse an, während IgG- und IgA-Antikörper nur in geringen Konzentrationen vorliegen (41, 74, 146, 158).
Verminderte Anti-T-Titer wurden bei Infektionskrankheiten (90), Vergiftungen (90), Tumoren (Leukämien, Adenocarcinomen, Lymphomen) (18,149) und nach Antibiotikabehandlung beobachtet.

Erhöhte Anti-T-Agglutinin-Titer konnten bei atypischer Pneumonie (73) und Leberzirrhose (19) nachgewiesen werden.

2.2 BEDEUTUNG DER NEURAMINIDASE ALS PATHOGENETISCHER FAKTOR

Die pathogenetische Bedeutung der Neuraminidase ist größer als lange vermutet wurde, da ihr Substrat, die N-Acetyneuraminsäure (NANA), wesentlicher Bestandteil zahlreicher biologischer Strukturen ist und im Organismus folgende Hauptfunktionen erfüllt (161):

- eine biophysikalisch unspezifische Rolle als negativ geladenes Molekül
- ein Bestandteil an der Bildung biologischer Rezeptoren
- eine schützende und maskierende Funktion für autoantigenetische Strukturen.

Durch Abspaltung der NANA und Freilegung von T-Antigenen schädigt die Neuraminidase vor allem folgende Zelltypen bzw. Proteine:

- Erythrozyten
- Thrombozyten
- Endothelien
- Plasmaproteine

Neuraminidasewirkung an Erythrozyten

Außer der Demaskierung des T-Rezeptors auf Erythrozyten bewirkt die Abspaltung der Neuraminsäure eine Reduzierung der negativen Oberflächenladung und damit eine Verkleinerung des Zetapotentials um den Erythrozyten, wodurch eine er-

höhte Agglutinationsneigung entsteht (48,89,117, 131,156,160). Zusätzlich verlieren die Erythrozyten durch den Verlust an Ladungen und den neuraminidasebedingten Kaliumverlust der Zelle an Rigidität und werden im RES vermehrt abgefangen und abgebaut (152). Die Überlebenszeit der Erythrozyten ist dadurch stark verkürzt, nach FISCHER bis auf ein Viertel der normalen Zeit (38,54,69,70,113,120).

Durch Neuraminidasewirkung werden am Erythrozyten zusätzlich neuraminsäurehaltige Rezeptoren wie Blutgruppenantigene M und N sowie Rezeptoren von Myxoviren inaktiviert (9,10,134,142).

Neuraminidasewirkung an Thrombozyten

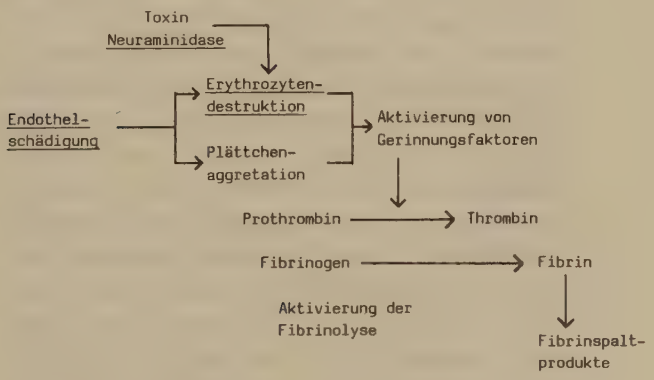
GLOECKNER fand zum ersten Mal an neuraminidasebehandelten Thrombozyten freigelegte T-Antigene (49). Weitere Untersuchungen in vivo und in vitro zeigten, daß die Einwirkung von Neuraminidase auf Thrombozyten zu Thrombozytopenien führt (24,53, 55). Dies wird zum einen durch die raschere Beseitigung der Thrombozyten aus dem Blutstrom durch das RES erklärt (70) und zum anderen durch die Bildung von Aggregaten, die durch den Verlust negativer Oberflächenladungen entstehen.

Neuraminidasewirkung an Endothelien

Eine neuraminidaseinduzierte Schädigung von Endothelien wurde bisher nur im Zusammenhang mit dem HUS an Nierenkapillarendothelien nachgewiesen. Mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik konnte der Nachweis einer T-Kryptantigenfreilegung verschiedentlich gezeigt werden (73,76,120,122,163). KLEIN wies bei zwei Kindern mit Pneumokokkenpneumonie und -sepsis und typischen Zeichen eines HUS das erste Mal an Erythrozyten und Nierenglomeruli einer menschlichen Niere T_f-Antigene (T_f-IgM-C_3-Komplement) nach (73). FISCHER und POSCHMANN konnten bei anderen Patienten mit den gleichen Syndromen an frischen Kryostatschnitten der Niere zusätzlich Fibrinablagerungen am Endothel feststellen (41).

Die Bildung von Fibrinablagerungen wird in Abbildung 1 dargestellt:

Abbildung 1:



(FISCHER und POSCHMANN in Anlehnung an LANZOWSKY) (41)

Die Pathogenese des ANV kann mit der Bildung intrakapillärer und intraarterieller Fibrinthromben und ausgedehnter Fibrinablagerungen mit Nierenrindennekrosen erklärt werden (121).

Neuraminidase gehört zu den wenigen bakteriellen Enzymen, die native Proteine angreifen, ihre biologische Funktionsfähigkeit verändern und sie für sekundäre Enzymwirkungen anfälliger machen. Bei Plasmaproteinen mit hohem Neuraminsäuregehalt (Albumin, saures $_1$-Glykoprotein, Haptoglobin, Transferrin, Hämopexin, IgA, Fibrinogen, Erythropoetin) äußert sich die Wirkung der Neuraminidase in einer verminderten immunelektrophoretischen Beweglichkeit (41,70,96) und einer kürzeren Verweildauer im Blutstrom (70). Am Fibrinogenmolekül führt der Verlust von endständigen Neuraminsäuregruppen zu einer thrombinunabhängigen Fibrinbildung (102).

Eine neuraminidaseinduzierte Schädigung dieser bisher untersuchten Zelltypen mit den Folgen von Anämien, Thrombozytopenien, Koagulationsanomalien und akutem Nierenversagen zeigen die klinische Bedeutung der Neuraminidase. Die Schädigung dieser verschiedenen Zelltypen erfolgt meistens nicht gleichzeitig. Erst nach Alteration der Plasmaproteine tritt eine Schädigung der Erythrozytenmembran mit einer T-Antigenfreilegung ein, die wiederum erst nach mehreren Tagen zu einer Hämolyse führt (121). Eine Endothelschädigung ist nur durch besonders hohe Enzymaktivitäten möglich und kann durch frühzeitige Therapie mit Heparin verhütet werden (121). Der Anti-T_{Ah} Screening Test wurde daher in der vorliegenden Arbeit bei allen

Patienten mit Infektionszeichen unabhängig von einem beschleunigten Blutabbau durchgeführt.

Die pathogenetische Bedeutung der Neuraminidase bei septischen Infektionen kann folgendermaßen erklärt werden:
Die Abspaltung der Neuraminsäure äußert sich in einem Verlust an negativen Ladungen und damit einer erheblichen Abnahme des mittleren Abstandes von Blutzellen (Erythrozyten, Thrombozyten), wodurch eine Erhöhung der Blutviskosität entsteht (127). Die Verlangsamung des Blutstroms sowie die Panagglutinationseigenschaft der Erythrozyten führen zu Aggregatbildungen der Blutzellen, die Zirkulationsstörungen bis hin zum vollständigen Verschluß der Endstrombahnen verursachen können (38). Zusätzlich läßt sich durch die Wirkung der Neuraminidase eine erhöhte Aggregation der Thrombozyten infolge Verlust negativer Oberflächenladung (24,55) und eine vermehrte Vernetzung von Fibrinogen durch den Verlust endständiger Neuraminsäuregruppen nachweisen (102). Die dadurch entstehenden Verstopfungen der Kapillaren führen zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit zunehmendem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren. Hohe Neuraminidaseaktivitäten führen zusätzlich zu Gefäßendothelläsionen. Dieser Prozeß setzt gerinnungsaktive Stoffe frei und kann in eine intravasale Gerinnung einmünden (12). Überschüssige Zwischen- und Endprodukte der Gerinnung werden dabei vom Retikulo-Histiozytären System, insbesondere den Endothelien der Nierengefäße durch Phagozytose aufgenommen;

dies kann zu Zellschädigungen, Endothelwucherungen und Fibrinablagerungen führen (122).

Es zeigt sich, daß die pathogene Wirkung von Neuraminidase weniger auf der Schädigung eines einzelnen Organs oder einer bestimmten Funktion des Organismus beruht, sondern auf einer Vielzahl verschiedener Reaktionen.

3. PATIENTENGUT, METHODE UND MATERIAL

3.1 PATIENTENGUT

Auf der chirurgischen Intensivstation der Universitätsklinik Tübingen wurde von April bis September 1981 bei 64 Patienten (männlich 40, weiblich 24) im Alter von 19 bis 83 Jahren mit Zeichen eines Infektes insgesamt 262 Blutproben entnommen und auf eine T-Antigendemaskierung an Erythrozyten untersucht. Als Auswahlkriterium wurde ein Temperaturanstieg >38,5° C mit dem Verdacht auf ein septisches Krankheitsgeschehen festgelegt.

Das Patientengut setzte sich hauptsächlich aus polytraumatisierten Patienten, sowie Patienten nach abdominalchirurgischen Eingriffen zusammen. Nahezu alle waren intubiert und wurden beatmet.

Auch wenn sich anfangs keine T-Antigenfreilegung nachweisen ließ, wurde an mindestens 3 bis 11 Tagen Blut entnommen und getestet. Bei agglutinationspositiven Patienten erfolgten an 2 (bedingt durch Exitus) bis maximal 26 Tagen Blutentnahmen.

Zusätzlich wurden 7 Patienten der internistischen Intensivstation mit Sepsisverdacht auf eine T-Demaskierung an Erythrozyten untersucht, es erfolgten jeweils 2 Blutentnahmen.

3.2 METHODE UND MATERIAL

3.2.1 Nachweis eines demaskierten T-Antigens am Erythrozyten

3.2.1.1 Direkter Anti-T_{Ah} Test

Zum Nachweis von demaskierten T-Antigenen wurde die bisher als empfindlichste bekannte Hämagglutinationsmethode mit dem Erdnuß-Lectin Anti-T_{Ah} (Direkter Anti-T_{Ah} Test) verwendet (38,41,120). Das Lectin reagiert spezifisch mit dem freigelegten Kryptantigen T_{Ah} und weist es durch Agglutination (positive Reaktion) nach.

Praktische Durchführung

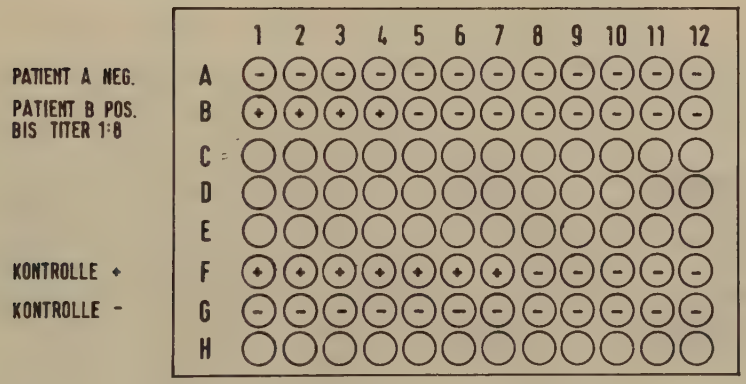
Um eine Neuraminidasewirkung in vitro zu vermeiden, wurde den Patienten jeweils 4 ml steriles, arterielles oder zentralvenöses Citratblut entnommen und unmittelbar danach verarbeitet (41). Das Blut wurde bei 3000 UpM 10 Minuten lang zentrifugiert, das Serum abgesaugt und die Erythrozyten mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und erneut 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert.
Der Waschvorgang wurde 2x wiederholt und das Erythrozytensediment 5%ig in 0,9%ige Kochsalzlösung suspendiert. Für den Agglutinationstest wurden U-förmige Mikrotiterplatten verwendet (88), so daß mit dem Mikrotitergerät eine Verdünnungsreihe von Anti-T_{Ah} bis zu einem Titer von 2048 hergestellt werden konnte. In jede Vertiefung wurden 25µl 5%ige Erythrozytensuspension getropft,

gut vermischt und die Mikrotiterplatte abgedeckt.

Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde auf Agglutination abgelesen.

Die Skizze veranschaulicht den Arbeitsvorgang:

1 25 µl NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 25 µl ANTI T_{AH}	+	+1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
3 25 ul ERY'S 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



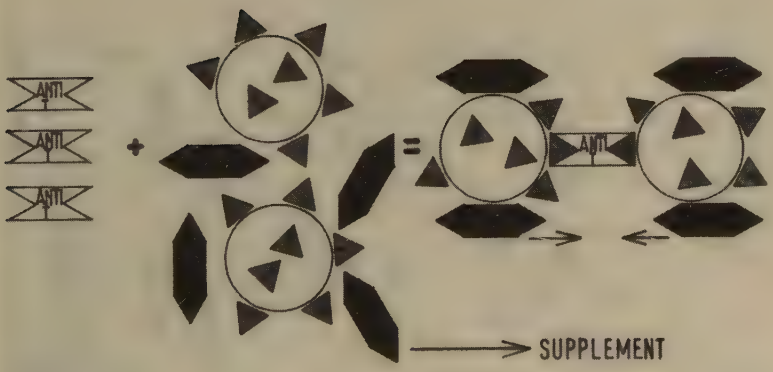
Für die Kontrollen wurde jeweils Blut von Blutspendern der Blutgruppe O verwendet, die nach den "Richtlinien der Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion" (1968) keine Auffälligkeiten zeigten.

Die Wirksamkeit des Erdnußlectin Anti-T_{Ah} wurde mit neuraminidasebehandelten Erythrozyten der Blutgruppe O überprüft. Dazu wurden 10 ml Citratblut der Blutgruppe O 3x mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. 1 ml Erythrozytensediment wurde mit 5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung und 1,25 ml Test-Neuraminidase versetzt und 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Erythrozyten 5%ig in Stabilisator suspendiert, wodurch die Positivkontrolle mindestens 5 Tage haltbar war.
Als Negativkontrolle wurden Erythrozyten der Blutgruppe O entsprechend mit Anti-T_{Ah} versetzt.

3.2.1.2 Anti-T_{Ah} Test mit Supplement

Erythrozyten sind mit negativen Oberflächenladungen umgeben, durch die sie sich gegenseitig abstoßen. Durch Zusatz von 25µl Rinderalbumin (22%ig) wurde das Zetapotential verringert, so daß sich die Erythrozyten soweit nähern können, daß die zweite Antigen-Bindungsstelle des Antikörpermoleküls den benachbarten Erythrozyten erreicht, mit ihm reagiert und zur Agglutination kommt (6).

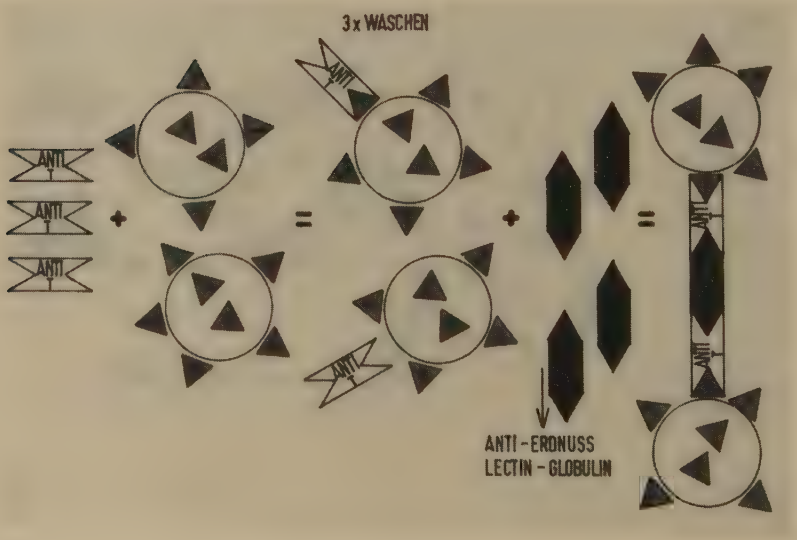
Abbildung 2:



3.2.1.3 Indirekter Anti-T_{Ah} Test

Abgelaufene Antigen-Antikörper Reaktionen, die nicht zu einer Agglutination geführt haben, können durch die zusätzliche Reaktion mit Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin vom Kaninchen sichtbar gemacht werden. Vor Zugabe des Anti-Erdnuß-Lectin-Globulins wurden die Erythrozyten in der Mikrotiterplatte 3x gewaschen, so daß nur mit Anti-T_{Ah} beladene Erythrozyten übrig blieben. Ohne den Waschvorgang könnte das Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin freies, nicht an T-Antigen gebundenes Anti-T_{Ah} neutralisieren und eine Agglutination verhindern.

Abbildung 3:



Für diesen erweiterten Test wurde der Ansatz des Anti-T_{Ah} Testes in eine zweite Mikrotiterplatte getropft. Nach 3 maligem Waschen wurde in jede Vertiefung 25µl Anti-Erdnuß-Lectin Globulin pipettiert, geschüttelt und nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mikroskopisch auf Agglutination abgelesen. Auch bei dieser Bestimmung wurden negative und positive Kontrollen mitgeführt.

Das Anti-Erdnuß-Lectin Globulin vom Kaninchen wurde durch Absorbtion mit nativen menschlichen ABO Erythrozyten von heterophilen Artantikörpern gegen Human-Erythrozyten befreit.

Dazu wurde das Anti-Erdnuß-Lectin Globulin mit 1/10 Volumen gewaschenen Erythrozyten 30 Minuten lang bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Hierdurch werden korrespondierende JgG-Antikörper des Anti-Erdnuß-Lectin Globulins vom Kaninchen absorbiert, die ihr Reaktionsoptimum bei 37° C haben (58). Nach 10 minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand nochmals mit 1/10 Volumen Erythrozyten versetzt und 45 Minuten bei 4° C auf JgM-Antikörper absorbiert. Da der 2. Überstand mit O-Testerythrozyten keine Agglutination mehr ergab, konnte auf eine weitere Inkubation verzichtet werden (7).

Dem Anti-T_{Ah} Reagenz und dem Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Reagenz wurden 0,02 %iges NaN_3 zugesetzt. Dadurch kann ein Bakterienwachstum durch Unterbrechung der Atmungskette verhindert werden (7).

3.2.1.5 Direkter Coombstest

Der direkte Coombstest dient zum Nachweis von Antikörpern, die bereits an Erythrozyten gebunden sind, jedoch zu keiner Agglutination führten. Da mehr als 90 % des Anti-T-Agglutinin im normalen menschlichen Serum der IgM-Klasse angehören (74), wurde als Coombsserum Anti-Human-IgM-Globulin verwendet.

Erythrozyten wurden 3x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Jeweils ein Tropfen 5%ige Erythrozytensuspension wurde mit einem Tropfen Coombslösung in einem Röhrchen gemischt und 2 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert. Nach leichtem Schütteln wurde auf Agglutination abgelesen.

3.2.1.4 Inkubation der Patientenerythrozyten mit Neuraminidase

Erythrozyten von 12 Patienten wurden mit Neuraminidase inkubiert. Methodisch wurde wie bei der Herstellung der positiven Kontrollen vorgegangen.

3.3. NEURAMINSÄUREBESTIMMUNG

Zum quantitativen Nachweis von Neuraminsäure im Serum wurde die Bestimmung mit dem Bial'schen Orcinreagenz (siehe 3.7.) durchgeführt (20).

Diese Methode beruht auf der Anwendung erhitzter, hochprozentiger Säuren, so daß die frei in Lösung befindlichen Neuraminsäuren nicht von den gebundenen zellständigen Neuraminsäuren getrennt werden können (56,91). Das Serum wurde mit Trichloressigsäure enteiweißt, da Neuraminsäuren nur im Eiweißanteil des Serums gefunden werden (20). Freie und gebundene Neuraminsäuren reagieren mit dem Bial'schen Orcinreagenz und entwickeln nach 15 Minuten langem Erhitzen im kochenden Wasserbad einen rotvioletten Farbstoff, dessen Extinktion der N-Acetylneuraminsäure proportional ist.
Die Lösung darf nur abgelesen werden, wenn die entwickelte Farbe blauviolett bzw. die mit Amylalkohol ausgeschüttelte Farbe graublau ist. Die Extinktion der Farblösung nimmt bei längerem Stehen nur gering ab (20).

Praktische Durchführung

0,05 ml Serum wurden mit 2 ml 10%iger Trichloressigsäure 10 Minuten zentrifugiert, der Niederschlag in 1 ml 5%ige Trichloressigsäure suspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Danach wurde erneut in 1 ml H_2O suspendiert, der Niederschlag mittels Glasstab aufgewirbelt und mit 1 ml Bial'sches Reagenz versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation in kochendem Wasserbad entwickelte sich eine rotviolette Farbe.

Das Gemisch wurde im Eiswasser gekühlt und mit 5 ml Amylalkohol ausgeschüttelt. Hierbei war eine Änderung des Farbtons von violett nach grau-blau charakteristisch. Es wurde nochmals kurz gekühlt und die kalte Lösung zentrifugiert, um Trübungen zu entfernen, die photometrische Bestimmungen verfälschen könnten. Die Farbintensität wurde im Spektralphotometer bei 570 nm gegen den Leerwert abgelesen, der entsprechend ohne Serum angesetzt wurde.

Für die Berechnung gilt nach der Eichkurve von BÖHM (20):

Extinktion x 500 = mg % Neuraminsäure

Der Neuraminsäuregehalt bei gesunden Personen liegt zwischen 40 und 65 mg%.

3.4. BESTIMMUNG DER NEURAMINIDASEAKTIVITÄT

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die von DERNICK (28) erweiterte photometrische Bestimmung mit der Thiobarbituratmethode nach WARREN (164) und AMINOFF (3,4) verwendet.

Die Methode ermöglicht die Bestimmung der freien Neuraminsäuren in Gegenwart von gebundener Neuraminsäure (34). Als Substrat können alle Substanzen verwendet werden, die Neuraminsäure enthalten (saures d_1-Glykoprotein, Fetuin, Haptoglobin, $ß_2$-Glykoprotein, Haemopexin oder d_2-HS-Glykoprotein) (177). Fetuin ist gut geeignet, da es einen hohen Neuraminsäuregehalt (8,7 %) hat und von bakteriellen Neuraminidasen am besten gespalten wird (106). Enthält das Patientenserum Neuraminidase, so wird vom Fetuin Acetylneuraminsäure abgespalten. Die Zugabe von Perjodat unterbricht einerseits die Enzymreaktion und spaltet andererseits die während der Inkubationszeit freigesetzte Neuraminsäure oxidativ in einen C_4-Körper (Formylpyruvat) und niedermolekulare Anteile. Das überschüssige Perjodat wird durch Zugabe von Natriumarsenit abgefangen. Durch den Kochvorgang entstehen aus dem ß-Formylpyruvat und der zugesetzten Thiobarbitursäure eine rosa- bis rotfarbige Verbindung, deren Farbintensität durch die Butanollösung verstärkt wird. Auch bei augenscheinlicher Entfärbung der Butanolschichten können die Extinktionen 2 Stunden als konstant betrachtet werden (91). Die gemessenen Extinktionen sind den N-Acetylneuraminsäurekonzentrationen direkt proportional (56,99). Von der Konzentra-

tion der N-Acetylneuraminsäure kann auf die Neuraminidaseaktivität geschlossen werden, da bei konstanter und hoher Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit bei gleichen Bedingungen der Menge des Reaktionsproduktes entspricht (99).

Da Neuraminidasen sehr labil sind, vor allem, wenn sie in starken Verdünnungen vorliegen (28), wurden Ca^{++}Ionen hinzugegeben, um die volle Enzymaktivität im menschlichen Plasma zu erhalten (34,52).

Praktische Durchführung

Den Patienten wurde jeweils 5 ml Blut entnommen und das Serum sofort eingefroren. Da das Enzym sehr empfindlich ist, wurden für einen Versuchsdurchgang nur 12 Patientenseren aufgetaut. 10 µl Serum wurden mit 30 µL Phosphatpuffer verdünnt und 5 Minuten im Wasserbad bei 37^{o} C belassen. Danach wurden in jedes Röhrchen alle 10 Sekunden 10 µl Fetuin pipettiert und das Enzym-Substrat-Gemisch 15 Minuten im Wasserbad bei 17^{o} C inkubiert. Wiederum in 10 Sekundenabständen erfolgte die Zugabe von 25 µl $NaJo_4$ Perjodat-Reagenz und der Testansatz wurde 30 Minuten im Wasserbad bei 37^{o} C inkubiert. Danach wurde alle 10 Sekunden ein Röhrchen ins Eisbad gestellt, 25 µl Arsenitlösung hinzugegeben und solange bei Raumtemperatur belassen, bis die braune Jodfarbe verschwunden war. Nach Zugabe von 200 µl Thiobarbitursäure wurden die verschlossenen Röhrchen für 25 Minuten im 80^{o} C Wasserbad inkubiert, danach in Eiswasser gekühlt, mit 500 µl Butanol

versetzt, gründlich geschüttelt und für 2 Minuten bei 550 UpM zentrifugiert. Es trat eine Phasentrennung ein und die Farbintensität der oberen, meist rosa bis rot gefärbten Butanolschichten wurde im Spektalphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

Zusätzlich wurde bei 30 Patientenseren und 30 Blutbankseren 5 µl $CaCl_2$ zugesetzt. Kontrollen ohne Ca-Zugabe wurden mitgeführt.

Die Berechnung der Neuraminidaseaktivität erfolgte nach DERNICK (20):

Testansatz: 10 µl Serumprobe auf 40 µl Test
Serumverdünnung: 1 : 4
Faktor der NANA Eichkurve: 2,62
Extinktion 550 nm: X = 0,209

Rechenbeispiel:

0,209 x 2,62 = 0,55 µg NANA/10 µl Serum verdünnt
0,55 x verdünnt 1:4 = 2,20 µl NANA/10 µl Serum unverdünnt

10 µl Virus = 2,20 µg NANA
1000 µl Virus = 220 µg/ml Virus/15 min
= 220 mg/l Virus/15 min
= 14,66 mg/l Virus/ min
309 mg NANA/l = 1,0 m Mol
14,66 mg/l = 0,047465 m Mol/l
= 47,47 µ Mol/l

Als Maß für die Aktivität der Neuraminidase gilt die Konzentration der vom Substrat Fetuin freigesetzten N-Acetylneuraminsäure.

3.5 BESTIMMUNG DES SERUM-HÄMOGLOBINS

Freies Hämoglobin im Serum wurde mit der photometrischen Bestimmung nach HELLER (61) ermittelt, die auf der Peroxydaseaktivität des Hämoglobins beruht.

Hämoglobinperoxidase oxidiert das Substrat (A) und überträgt den Wasserstoff auf H_2O_2 (21)

$$A\text{-}H_2 + B + 2H_2O_2 \xrightarrow[Hb]{\text{Peroxidase}} (AB)^{++} + 4H_2O$$

Die Menge des gebildeten Farbstoffproduktes (AB) wird bei einem Überschuß aller Reagenzien durch die Hämoglobinkonzentration bestimmt (68). SCHMIDT, STUNKAT, HELLER fanden im System 3-Methyl-2benzothiazolinonhydrazon/N,N-Dimethylanilin einen neuen Redoxfarbstoff, der den herkömmlichen Farbstoffbildern an Stabilität und Empfindlichkeit überlegen ist (128). Mit dieser Farbreaktion wurde eine geringe Zeitabhängigkeit, eine sehr gute Linearität und eine hohe Empfindlichkeit der Messung erreicht.

Praktische Durchführung

Bei jedem Durchgang wurden jeweils 20 Seren bestimmt. In jedes Röhrchen wurden 2 ml Arbeitslösung (siehe 3.7), 0,1 ml Serum und 0,5 ml H_2O_2 3%ig pipettiert, geschüttelt und 15 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Die Arbeitslösung wurde jeden Tag neu angesetzt. Je nach Hb-Gehalt zeigten sich verschiedene Farbreaktionen, die mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 585 nm gegen Wasser abgelesen wurden.

Mit dem Hämoglobinstandart von Hyland (15,9%) wurde eine Eichkurve angefertigt, aus der die Extinktionen entnommen wurden (61).
Der Normalwert für den Hb-Gehalt im Serum wird bis ca. 20 mg% angegeben.

3.6 Blutsenkungsgeschwindigkeit mit und ohne Neuraminidase

Bei 30 Spendern der Blutbank verschiedener Blutgruppen wurde jeweils Blut für 2 Blutsenkungen (2 ml / 4 ml Na-Citrat) entnommen. Eine der beiden Blutproben wurde mit 0,2 ml Test-Neuraminidase für 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert und anschließend im Blutsenkungsröhrchen aufgezogen.
Nach einer Stunde und nach zwei Stunden wurden die Werte abgelesen.

3.7 REAGENZIEN UND BEZUGSQUELLEN

Anti-T_{Ah} Test

Anti-T_{Ah}: Lectin aus der Ernuß (Arachis hypogaea) (Biotest, Sigma, Serva)

Neuraminidase: Hochgereinigte RDE "receptor destroying enzyme" aus Kulturfiltraten von Vibrio cholerae in Fläschchen zu 25 ml (= 1250 Einheiten) (Behring)

Stabilisator: Erythrozytenkonservierungslösung nach Brüster (Biotest)

Rinderalbumin: 22%ig (Biotest)

Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin vom Kaninchen: (Biotest)

Coombs-Serum: Anti-Human-JgM-Globulin (Biotest)

Neuraminsäurebestimmung

Trichloressigsäure: 10%ig + 5%ig (Merck)

Bial'sches Reagenz: 0,1 g Orcin (Merck) werden in 40,7 ml konzentrierter HCL gelöst, 1 cm^3 1%ige $FeCl_3$-Lösung zugefügt und mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt (bei 4^o C 14 Tage haltbar)

Amylalkohol: (Merck)

Neuraminidasebestimmung

Perjodat: 0,025 m Natriumperjodat (Merck) in 0,125 m H_2SO_4 lösen, 0,5348 gr $NAJO_4$ ad 100 ml 0,125 m H_2SO_4

Asenit: 2%ige Natriumarsenitlösung (Merck) in 0,5 m HCL

Thiobarbitursäure: 0,1 m Thiobarbitursäure (Merck) mit 1 n NaOH auf ph 9 einstellen. 7,21 gr Thiobarbitursäure mit Wasser auf 500 ml auffüllen. (Lichtgeschützt bei 4^{o} C 1 Monat haltbar).

Butanol: n Butanol (Merck) mit 5 % HCL

Phosphatpuffer: Phosphatpuffer pH 7,0 (Merck) 0,1 m Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4

Fetuin: 0,9 mg/ml Fetuin (Sigma) in 0,9 % NaCl

Calciumchlorid: 5 µmol Lösung: 7,351 g $CaCl_2$ ($CaCl_2$ - $2H_2O$, Molekulargewicht 147,02 g/mol) (Merck) ad 10 ml H_2O

Serum Hb-Bestimmung

100 mg MBTH: (2-Hydrazone 2,3 dihydro-3-methyl-benzothiazolhydrochlorid) (Merck)
ad 100 ml HCL 0,1 mol/l (n/10)
(1 Monat haltbar)

1 ml DMA: (N, N-dimethylaniline) (Merck)
ad 100 ml HCL 0,1 mol/l
(1 Monat haltbar)

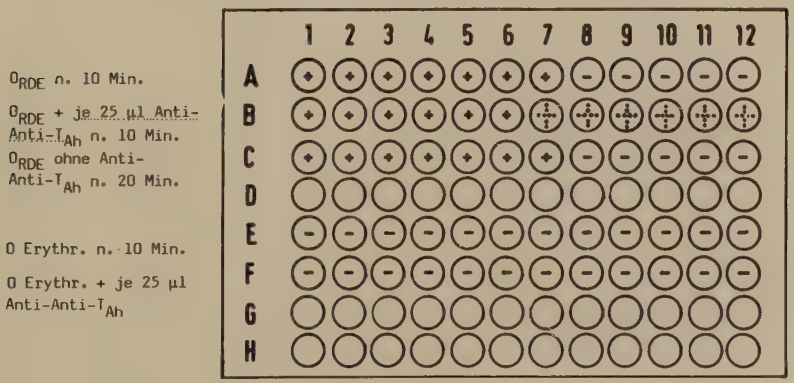
Arbeitslösung: 2,5 ml Lösung 1
5,0 ml Lösung 2
20,0 ml Essigsäure 10 mol/l (Merck)
(580 ml Eisessig auf 1 l Aqua dest.) ad 100 ml Aqua Dest.
(1 Tag haltbar).

4. ERGEBNISSE

4.1. NACHWEIS EINES DEMASKIERTEN T-ANTIGENS AM ERYTHROZYTEN

4.1.1. Optimierung des direkten Anti-T_{Ah} Test

Das Erdnußlectin Anti-T_{Ah} agglutinierte neuraminidasebehandelte Erythrozyten bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 64. Nach Zugabe des von korrespondierenden Antikörpern befreiten Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Testreagenz nahm die Agglutinationsfähigkeit der neuraminidasebehandelten Erythrozyten bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 2048 zu. Die Agglutination trat sofort ein.
Als Kontrollen wurden neuraminidasebehandelte Erythrozyten (O_{RDE}) ohne Anti-Erdnuß-Lectin Globulin mitgeführt, die nach derselben Zeit keine verstärkten Agglutinationen zeigten. Bei den Erythrozyten der Blutgruppe O fand nach Zugabe des Anti-Erdnuß-Lectin Globulins ebenfalls keine Agglutinationen statt.



Dies zeigte, daß das Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Testreagenz empfindlicher ist als das Anti-T_{Ah} Testreagenz und dadurch auch eine sehr schwache T-Demaskierung am Erythrozyten nachgewiesen werden kann.

Die sofortige Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Zugabe nach dreimaligem Waschen ergab erwartungsgemäß bei den neuraminidasebehandelten Erythrozyten keine unterschiedlichen Agglutinationstiter.

Die Notwendigkeit des Waschvorgangs vor Zugabe des Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin bestätigte sich bei verschiedenen Patientenerythrozyten. Es trat nach dreimaligem Waschen und Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Zugabe innerhalb von fünf Minuten eine Agglutination auf, während nach Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Zugabe ohne vorheriges Waschen des Erythrozyten-Anti-T_{Ah} Gemisches auch nach langem Warten keine Agglutination erkennbar war.
Das Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin kann in diesen Fällen freies, nicht an T-Antigen gebundenes Anti-T_{Ah} neutralisieren und damit eine Agglutination verhindern.

4.1.2. Verteilung der T-Antigenfreilegung im Patientengut

Die Untersuchungen wurden bei 64 Patienten im Alter von 11-83 Jahren durchgeführt. Hierbei diente ein Temperaturanstieg >38,5° C mit dem Verdacht auf ein septisches Krankheitsgeschehen als Auswahlkriterium.
Durch Erregernachweis aus Blutkulturen und Abstrichen (Bauchhöhlen-, Wund- und Trachealabstriche, Venen- und Blasenkatheterabstriche) konnte bei 60 Patienten eine Infektionsquelle gesichert werden. 4 Patienten ohne Erregernachweis erfüllten neben septischen Temperaturen keine weiteren Infektionszeichen, so daß für statistische Vergleiche nur von 60 Patienten ausgegangen wurde. Diese 60 Patienten erfüllten die beiden Kriterien septische Temperaturen bei einem klinischen Infektionsherd mit Erregernachweis.

Nach den von DUSWALD zusammengestellten Kriterien für eine Sepsis (36)

- klinischer Infektionsherd mit Erregernachweis
- Temperaturanstieg >38,5° C
- Leukozytose > 15 000/ml
  Leukopenie < 5 000/ml
- Thrombopenie < 100 000/ml
- (positiver Erregernachweis im Blut)

konnte bei 33 Patienten eine Sepsis angenommen werden. Von insgesamt 17 Patienten mit einem T-Kryptantigennachweis am Erythrozyten erfüllten 12 diese Kriterien für eine Sepsis.

Bei 2 von 60 Patienten erfolgte mit dem direkten Anti-T_{Ah} Test und bei 15 von 50 Patienten mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test ein T-Antigennachweis am Erythrozyten.

Dabei konnte von 262 Blutentnahmen bei 76 Proben der Nachweis demaskierter T-Antigene erbracht werden.

Die Zusammensetzung des Patientenguts mit der entsprechenden T-Kryptantigendemaskierung wurde in Tabelle 2 dargestellt.

T-Antigenfreilegung:

+++ direkter Anti-T_{Ah} Test Titer $\leq$ 128
++ indirekter Anti-T_{Ah} Test Titer $\leq$ 128
+ indirekter Anti-T_{Ah} Test Titer = 1
- keine Agglutination

Tabelle 2:

Grundkrankheiten	insgesamt	Direkter Anti-T_{Ah} Test	Indirekter Anti-T_{Ah} Test		keine Agglutination
		+++	++	+	-
CHIRURGISCHE PATIENTEN					
Polytrauma	25	1	4	2	18
Abdominalchir. E.	12	1	4	1	6
Kardio- u. Gefäßchir. E.	4		1		3
Neurochir. E.	4				4
Meningitis	2				2
Postpartale Blutung	2		1		1
Nephrektomie	1				1
Tetanus	1				1
Aspirationspneumonie	1			1	
Dekom. Leberzirrhose	1			1	
INTERNISTISCHE PATIENTEN					
Unklare Sepsis	7				7
Insgesamt	60	2	10	5	43

4.1.2.1 Direkter Anti-T_{Ah} Test

Von 60 Patienten konnte bei 2 Patienten eine T-Antigenfreilegung am Erythrozyten durch Agglutination mit dem Anti-T_{Ah} Testreagenz nachgewiesen werden.

1. Fallbeschreibung:

36jähriger Patient mit Zustand nach offenem Schädelhirntrauma, Mittelhirnkontusion und multiplen Gesichtsfrakturen.
Der Patient entwickelte vom 11. stationären Tag an Temperaturen über 39,8° C. Bei der ersten Blutentnahme am 11. Tag ergab sich mit dem Anti-T_{Ah} Testreagenz eine Agglutination bis zu einem Titer von 4. An weiteren 12 Tagen erfolgten mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test Agglutinationen bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer zwischen 128 und 8. Nach dem 32. stationären Tag konnten mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test nur vereinzelt Agglutinationen mit einem Titer von 1 nachgewiesen werden.

Am 15. stationären Tag wurde eine Sepsis anhand der Klinik und den Kriterien von DUSWALD mit einem Blutkulturnachweis von Staphylokkokus epidermidis gesichert. Im Trachealabstrich wurden an neuraminidasefreisetzenden Mikroorganismen vom 11. Tag an mehrfach Enterokokken und vom 19. Tag an mehrfach Pseudomonas aeruginosa isoliert.
Um den 15. Tag trat zusätzlich eine schwere Pneumonie auf. Der Patient wurde ständig antibiotisch hoch dosiert behandelt und war heparinisiert.
Die HB-Werte schwankten bei wiederholten Bluttransfusionen zwischen 10,9 g% und 7,9 g%. Im

Serum wurden bei hohen Anti-T_{Ah} Agglutinationstitern stark erhöhte Neuraminidaseaktivitäten bis 63,6 µMol/l (Norm bis 15 µMol/l) und erhöhte Serum-Hämoglobinwerte bis 149 mg % (Norm bis 20 mg%) festgestellt. Bei dem indirekten Anti-T_{Ah} Test mit einem Agglutinationstiter von 1 lagen normale Serum-Hb Werte und normale Neuraminidaseaktivitäten vor.
Der Patient entwickelte nach dem 12. stationären Tag ein dialysepflichtiges akutes Nierenversagen, das auf kein hämorragisches Schockgeschehen zurückgeführt werden konnte. Nach 14maliger Dialyse stabilisierte sich die Nierenfunktion.
Der Patient war ständig intubiert und wurde kontrolliert beatmet. Nach den von PONTOPPIDAN (118) aufgestellten Kriterien wurde ein akutes Lungenversagen diagnostiziert.
Nach anhaltendem cerebralem Koma und plötzlichen massiven Magenblutungen verstarb der Patient am 52. stationären Tag im Herzkreislaufversagen.
Bei der Sektion fanden sich als Zeichen eines Schocks zahlreiche Fibrinthromben in Niere, Lunge und Leber. Zeichen einer Sepsis wurden nicht mehr festgestellt.

2. Fallbeschreibung:

75jähriger Patient mit Zustand nach Rectosigmoidresektion bei Adenokarzinom, Anlegen eines Querkolonkunstafters bei Anastomoseninsuffizienz. Der Patient entwickelte postoperativ eine schwere Unter- und Oberbauchperitonitis mit septischen Temperaturen um 39,5° C. Es wurden aus der Bauchhöhle Escherischia Coli Bakterien isoliert, die keine Neuraminidase freisetzen, jedoch für einen

Synergismus zwischen dem Enterotoxin bestimmter E. Coli Typen und der Neuraminidase bekannt sind (140,135,151). Am 3. postoperativen Tag konnte mit dem Anti-T_{Ah} Test eine Agglutination bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 4 nachgewiesen werden. Am darauffolgenden Tag war ein Abfall des Hämoglobins von 13,6 g% bis 9,3 g% zu beobachten. Im Serum wurde ein erhöhter Hb-Wert von 28 mg% (Norm bis 20 mg%) sowie eine erhöhte Neuraminidaseaktivität von 28,5 µMol/l nachgewiesen (Norm bis 15 µMol/l).
Klinisch war eine geringgradige Niereninsuffizienz bei einem Kreatinin zwischen 0,8 mg% und 1,2 mg% festzustellen.
Der Patient atmete spontan bei einer O_2-Zufuhr zwischen 20 % und 40 %.
Am 7. postoperativen Tag verstarb der Patient im Herzkreislaufversagen. Bei der Sektion wurden Zeichen des akuten Nierenversagens nachgewiesen.

4.1.2.2 Indirekter Anti-T_{Ah} Test

Bei 50 Patienten wurde zusätzlich mit dem Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Testreagenz nach einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten gesucht.
Davon zeigten 10 Patienten Agglutinationen bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 128 und 5 Patienten Agglutinationen mit einem Titer von 1. Die Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin Agglutinationen mit einem Anti-T_{Ah} Titer von 1 konnten nur dann nachgewiesen werden, wenn vor Zugabe des Anti-Erdnuß-Lectin-Globulins das Anti-T_{Ah} Erythrozytengemisch 3 mal gewaschen wurde.

Von 25 polytraumatisierten Patienten wurden bei 7 Patienten und von 12 Patienten mit abdominalchirurgischen Eingriffen bei 6 Patienten freigelegte T-Antigene am Erythrozyten nachgewiesen (siehe Tabelle 2).

Nach wiederholten Blutentnahmen konnten bei insgesamt 43 Patienten auch mit der erweiterten Testmethode keine T-Antigendemaskierung am Erythrozyten festgestellt werden.

4.1.2.3 Direkter Coombstest

Der direkte Coombstest wurde bei 50 Patienten mit dem Anti-Human-IgM Globulin durchgeführt. Von 2 Anti-T_{Ah} positiven Patienten war ein Patient coombspositiv und von 15 Anti-Erdnuß-Lectin-Globulin positiven Patienten waren 3 coombspositiv. Bei allen Patienten, die keine demaskierten T-Antigene am Erythrozyten aufzeigten, lag ein negativer direkter Coombstest vor.

4.1.2.4 Inkubation der Patientenerythrozyten mit Neuraminidase

Erythrozyten von Patienten mit keiner nachgewiesenen T-Antigendemaskierung zeigten nach Inkubation mit Neuraminidase mit dem Erdnuß-Lectin sofort Agglutinationen bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 64.

4.2 BESTIMMUNG DER NEURAMINSÄURE UND DER NEURAMINIDASE

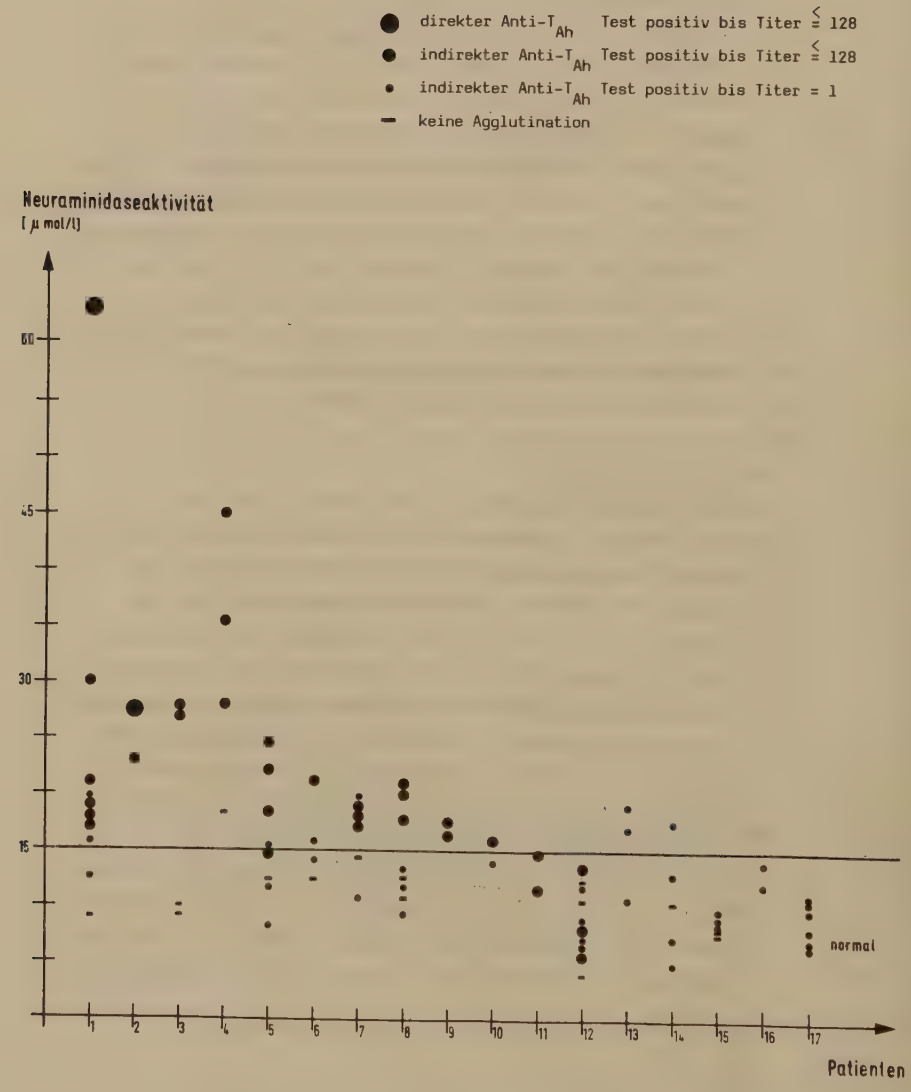
Neuraminsäure

Die Bestimmung der Neuraminsäure wurde an 70 eingefrorenen Serumproben von 14 Patienten vorgenommen.
Von 34 Serumproben mit nachgewiesener T-Kryptantigenfreilegung am Erythrozyten lag bei 12 Proben ein stark verminderter Neuraminsäuregehalt im Serum vor. Diese verminderten Neuraminsäurewerte schwankten zwischen 23,0 mg% und 37,0 mg% bei einem Normalwert von 40-65 mg%.
Bei allen Serumproben der Patienten ohne T-Kryptantigenfreilegung am Erythrozyten lag der Neuraminsäuregehalt im Normalbereich.

Neuraminidase

Die Neuraminidaseaktivität wurde von 193 verschiedenen Patientenseren und 30 Kontrollseren der Blutbank jeweils sofort nach dem Auftauen bestimmt. Die Kontrollseren ergaben einen Mittelwert $\bar{X}$= 8,84 µMol/l $\pm$ s=1,98 (mittlere Standartabweichung). Als obere Grenze einer Neuraminidaseaktivität wurde der Mittelwert plus die 3fache mittlere Standartabweichung ($\bar{x}+3s$) angenommen, so daß eine Aktivität >15 einer erhöhten und <15 einer normalen Neuraminidaseaktivität entspricht.
In Abbildung 4 (siehe Seite 42) wurde von allen 17 T-Antigen positiven Patienten die Neuraminidaseaktivität jeder Blutentnahme im Vergleich zur jeweiligen Titerhöhe der T-Agglutination aufgetragen.

Abbildung 4: Neuraminidaseaktivität und T-Antigenfreilegung



Bei beiden Anti-T_{Ah} Test positiven Patienten (1,2) lagen stark erhöhte Neuraminidaseaktivitäten vor. Von 10 Patienten (3-12) mit Anti-Erdnuß-Lectin Globulin positiven Agglutinationen bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 128, ließ sich bei 8 Patienten (80 %) ein erhöhter Neuraminidasespiegel nachweisen. Mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test erfolgte bei diesen Patienten 30 mal ein T-Antigennachweis, der in 24 Fällen (80 %) mit einer erhöhten Neuraminidaseaktivität übereinstimmte. Von 5 Patienten (13-17) mit schwach positiven Anti-Erdnuß-Lectin Globulin T-Agglutinationen (Titer von 128) wiesen nur 2 Patienten erhöhte Neuraminidaseaktivitäten auf. Dabei zeigten von 18 Anti-Erdnuß-Lectin Globulin schwach positiven Seren nur 3 erhöhte Neuraminidaseaktivitäten (16,7 %).

Von 43 T-Antigen negativen Patienten wurden insgesamt 111 verschiedene Seren auf eine Neuraminidaseaktivität untersucht. Bei 104 Seren (88,4 %) konnte erwartungsgemäß keine Neuraminidaseaktivitätserhöhung festgestellt werden. 7 Patienten wiesen jeweils einmal einen leicht erhöhten Neuraminidasespiegel ohne nachgewiesene T-Antigendemaskierung am Erythrozyten auf. Da bei 2 dieser Patienten nur der direkte Anti-T_{Ah} Test angewandt werden konnte, ist nicht auszuschließen, daß ein T-Antigennachweis mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test möglich gewesen wäre.

Durch Zugabe von 5 µl $CaCl_2$ wurden bei Patientenseren sowohl erhebliche Neuraminidaseaktivitätszunahmen als auch Abnahmen beobachtet. Der Mittelwert der Patientenseren ohne 5 µl $CaCl_2$-Zusatz

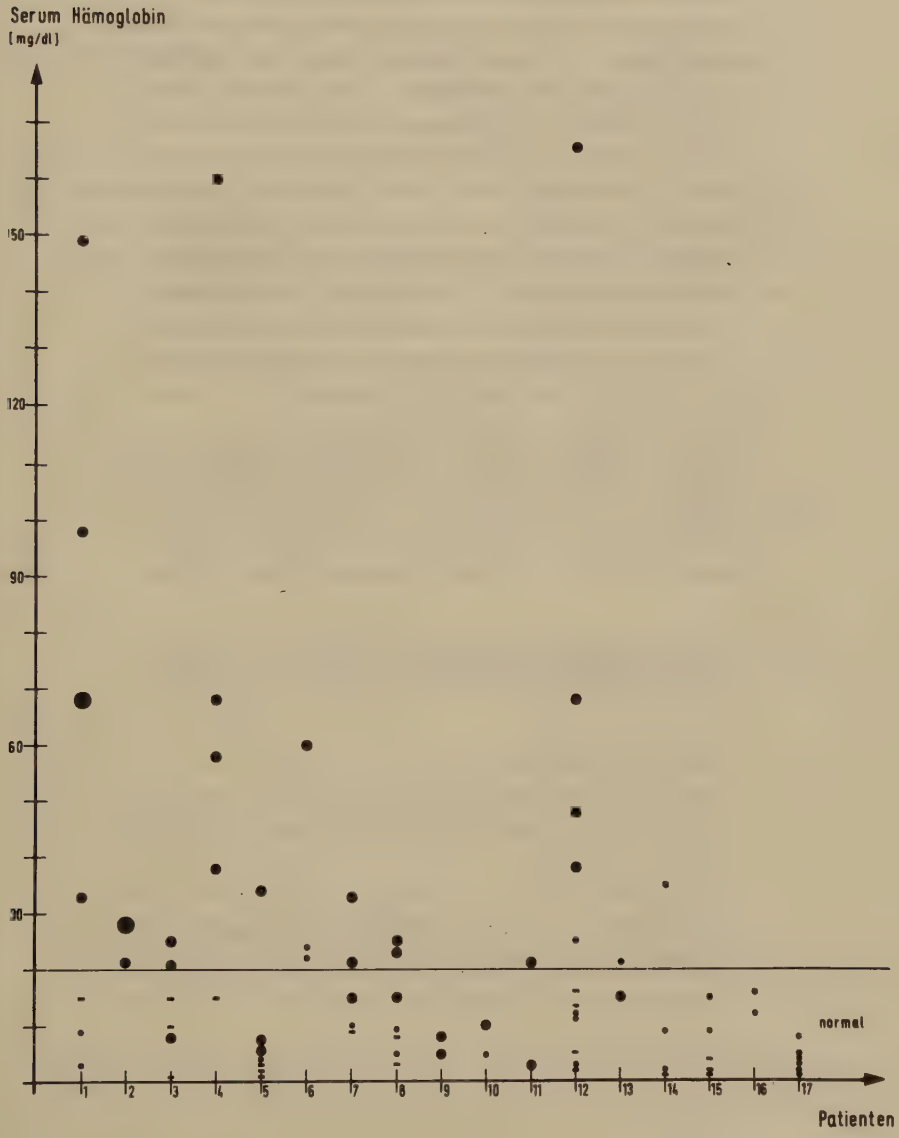
lag bei $\bar{x}$=9,98 µMol/l ± $s_{\bar{x}}$=3,59 ($s_{\bar{x}}$ = mittlere Standartabweichung) mit 5 µl $CaCl_2$ Zusatz bei $\bar{x}$ = 12,05 µMol/l ± $s_{\bar{x}}$=3,88 Neuraminidaseaktivität. Die Kontrollen der Blutbank zeigten geringere Unterschiede; ohne $CaCl_2$-Zusatz lag der Mittelwert bei $\bar{x}$=8,84 µMol/l ± $s_{\bar{x}}$ = 1,98; mit $CaCl_2$-Zusatz bei $\bar{x}$ = 9,97 µMol/l ± $s_{\bar{x}}$ = 2,12 Neuraminidase-aktivität.

4.3. BESTIMMUNG DES HÄMOGLOBINS IM SERUM

Das Serumhämoglobin wurde von 184 Patientenseren und 30 Kontrollseren der Blutbank bestimmt. Die Kontrollseren ergaben einen Mittelwert von x = 3,48 mg% ± $s_{\bar{x}}$ = 4,82. Als obere Grenze des Normalwertes wurde $\bar{x}$ + 3s festgelegt, so daß Werte >20 mg% als Hämolyse und Werte <20 mg% nicht als Hämolyse interpretiert wurden. In der Literatur wurde der Normalwert ebenfalls bis zu 20 mg% angegeben (61).

In Abbildung 5 (siehe Seite 45) wurde von allen 17 T-Antigen positiven Patienten der Hämoglobingehalt jeder Blutentnahme im Vergleich zur jeweiligen Titerhöhe der T-Agglutination aufgetragen.

Abbildung 5: Serumhämoglobin und T-Antigenfreilegung



Bei beiden Anti-T_{Ah} positiven Patienten (1 und 2) lagen mehrmals stark erhöhte Serum Hb-Werte vor. Von 10 Anti-Erdnuß-Lectin Globulin stark positiven Patienten (3-12) mit Agglutinationstiter $\leq$ 128 konnte bei 8 Patienten eine Hämolyse festgestellt werden. Dabei korrelierten von 30 Anti-Erdnuß-Lectin Globulin positiven Probenergebnissen 20 (70 %) direkt mit einer Serum Hb-Erhöhung, während bei 9 T-Antigen positiven Blutproben keine Hämolyse im Serum vorlag. Von 5 Patienten mit Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Agglutinationen bis zu einem Titer von 1 zeigten nur 2 eine Serum Hb-Erhöhung, dabei waren von 14 T-Antigen positiven Ergebnissen 2 Serum Hb-Bestimmungen positiv (siehe Abbildung 5).

Von 105 Serumproben T-Antigen negativer Patienten fanden sich erwartungsgemäß bei 100 Proben (95,4 %) normale Serum Hämoglobinwerte. 4 Patienten zeigten bei 5 Proben erhöhte Serum Hb-Werte.

4.4. BLUTSENKUNGSGESCHWINDIGKEITEN MIT UND OHNE NEURAMINIDASE

Die Blutsenkungen zeigten nach Inkubation mit Neuraminidase keine veränderten Werte im Vergleich zu den Blutsenkungen derselben Personen ohne Neuraminidase.
Die Vermutung, daß es durch Senkung der Oberflächenladung infolge Neuraminsäureabspaltung zu einer erhöhten Blutsenkungsgeschwindigkeit kommt (63,67), konnte demnach nicht bestätigt werden.

4.5. DEMASKIERTE T-ANTIGENE UND BAKTERIELLE BEFUNDE

Da von den untersuchten 60 Intensivpatienten alle bis auf einen Patienten mit Antibiotika behandelt wurden, waren Erregernachweise mit Schwierigkeiten verbunden. Bei 21 Patienten mit dem Verdacht auf eine Sepsis wurden Blutkulturen angelegt.
Es erfolgte bei 9 Patienten ein positiver Erregernachweis, jedoch mit nicht neuraminidasefreisetzenden Mikroorganismen (Escherischia Coli, Staphylokokkus aureus, nicht hämolysierende Streptokokken, Enterobacter agglomerans, Listeria monocytogenes, Staphylokokkus epidermis, Sproßpilze).
Bei 4 dieser 9 Blutkultur positiven Patienten lag eine T-Antigenfreilegung am Erythrozyten vor.

An neuraminidasefreisetzenden Bakterien konnten aus verschiedenen Abstrichen (Wunde (W), intraperitoneal (IP), Venenkatheter (VK), Trachea (TR), Dauerkatheter (DK)) mehrfach Bacteroides spezies, Enterokokken und Pseudomonas isoliert werden.

Diese bakteriellen Befunde wurden in Beziehung zur T-Antigenfreilegung am Erythrozyten in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: T-Antigenfreilegung am Erythrozyten und bakterielle Befunde

Bakterielle Nachweise	Abstriche	Direkter Anti-T_{Ah} Test +++		Indirekter Anti-T_{Ah} Test ++		+	keine Agglutination -	
steril		0		0		0	5	
Bacteroides (+++)	W, IP VK TR DK	0		4	4	0	1	1
Enterokokken (++)	W, IP VK TR DK	1 1	2	3 3 2 2	10	0	1 1 2	4
Pseudomonas (+)	W, IP VK TR DK	1 1	2	1 3 2	6	2 2 1	5	2 3 13 5	25

Bei 13 von 17 T-Antigen positiven Patienten (77 %) wurden in Abstrichen neuraminidasefreisetzende Bakterien nachgewiesen.
Bei 24 von 43 T-Antigen negativen Patienten (50 %) erfolgte ebenfalls der Nachweis neuraminidasefreisetzender Bakterien. In den Abstrichen wurden jedoch überwiegend Pseudomonas Erreger nachgewiesen, die eine niedere, teilweise umstrittene Neuraminidaseaktivität besitzen (siehe Diskussion).

In Tabelle 4 wurden neuraminidasefreisetzende Bakterien in Beziehung zur T-Antigenfreilegung dargestellt. Zwischen dem Nachweis neuraminidasefreisetzender Bakterien und einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

Tabelle 4: Neuraminidasefreisetzende Bakterien in Beziehung zur T-Antigenfreilegung am Erythrozyten

Patienten	Direkter Anti-T_{Ah} Test +++	Indirekter Anti-T_{Ah} Test ++	Indirekter Anti-T_{Ah} Test +	keine Agglutination -
mit neuraminidasefreisetzenden Bakterien	1	8	4	24
ohne neuraminidasefreisetzenden Bakterien	1	2	1	19
insgesamt	2	10	5	43

4.6. DEMASKIERTE T-ANTIGENE BEI VERSCHIEDENEN KRANKHEITSBILDERN

Die Korrelation zwischen dem Auftreten einer T-Antigendemaskierung am Erythrozyten und den Folgen einer Hämolyse, eines akuten Nierenversagens und eines akuten Lungenversagens wurden mit der Vierfeldertafel und der Chi-Quadrat Methode (X^2) ermittelt. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen dem Auftreten von demaskierten T-Antigenen und den möglichen Ursachen einer Pneumonie und einer Peritonitis errechnet.
Lagen die erwarteten Häufigkeiten bei Werten ≤ 5, so erfolgte die Berechnung von X^2 unter Berücksichtigung der Yateskorrektur (25).

Zwischen dem Auftreten einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten und der Folge einer Hämolyse bestand bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0,01 ein hoch signifikanter Zusammenhang, da $X^2 > X^2_{0,01,1}$.

Hämolyse

Demaskierte T-Antigene	ja	nein	
ja	12	5	17
nein	5	38	43
	17	43	60

$X^2_{0,05,1} = 3,84$

$X^2_{0,01,1} = 6,63$

$X^2 = 18,06$

Zusätzlich konnte bei Patienten mit demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten signifikant häufiger ein akutes Nierenversagen (Oligo-,Anurie) und ein akutes Lungenversagen (nach PONTOPPIDAN) beobachtet werden.

ANV

		ja	nein	
Demaskierte	ja	5	12	17
T-Antigene	nein	2	41	43
		7	53	60

$X^2_{0,95,1} = 3,84$

$X^2 = 5,04$

ARDS

		ja	nein	
Demaskierte	ja	8	9	17
T-Antigene	nein	5	38	43
		13	47	60

$X^2_{0,99,1} = 6,63$

$X^2 = 7,04$

Zwischen dem Auftreten von T-Antigenen am Erythrozyten und den möglichen Ursachen einer Pneumonie und einer Peritonitis konnte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 ebenfalls eine Signifikanz ermittelt werden.

Pneumonie

Demaskierte T-Antigene	ja	nein	
ja	10	7	17
nein	11	32	43
	21	39	60

$\chi^2_{0,95,1} = 3,48$

$\chi^2 = 4,2$

Peritonitis

Demaskierte T-Antigene	ja	nein	
ja	6	11	17
nein	4	39	43
	10	50	60

$\chi^2_{0,95,1} = 3,48$

$\chi^2 = 4,2$

Zwischen einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten und dem Auftreten von Mortalität ergab sich kein signifikanter Zusammenhang.

Mortalität

		ja	nein	
Demaskierte	ja	7	10	17
T-Antigene	nein	16	27	43
		23	37	60

$X^2_{0,90,1} = 2,71$

$X^2 = 0,00$

Es zeigte sich, daß bei Patienten mit Pneumonien und Peritonitiden signifikant häufiger demaskierte T-Antigene am Erythrozyten nachzuweisen sind und daß diese Patienten signifikant häufiger eine Hämolyse, ein akutes Nierenversagen und ein akutes Lungenversagen entwickeln.

5. DISKUSSION

5.1. DISKUSSION DER METHODE

Methode zum Nachweis einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten

In dieser Arbeit wurde bei febrilen Intensivpatienten mit nachgewiesenem Infektionsherd nach einer neuraminidaseinduzierten T-Antigendemaskierung am Erythrozyten gesucht.
Demaskierte T-Kryptantigene auf Erythrozyten werden durch folgende Reagenzien agglutiniert:

1. Anti-T : T-agglutinierende Seren menschlicher und tierischer Herkunft (122).
2. Anti-A_{HP}: Ein Extrakt aus der Eiweißdrüse der Weinbergschnecke (Helix pomatia) (129).
3. Anti-T_{Ah}: Ein Kochsalzextrakt aus der Erdnuß (Arachis hypogaea) (8).

Serum T-Agglutinine menschlicher und tierischer Herkunft haben durch ihre geringen Anti-T Titer erhebliche Nachteile. Zusätzlich sind bei T-Agglutininen tierischer Herkunft unspezifische heterophile Artantikörper zu berücksichtigen (122).

Anti-A_{HP} zum Nachweis demaskierter A_{HP}-Kryptantigene kann durch seine Blutgruppenspezifität nicht bei Patienten der Blutgruppe A und AB eingesetzt werden und die Kryptantigene A_{HP} werden nur bei stärkerer Neuraminidasewirkung freigelegt (37,122).

Es wurde daher zum Nachweis von demaskierten T-Antigenen an Erythrozyten der Hämagglutinationssuchtest mit Anti-T_{Ah} Testreagenz verwendet, der neben der Immunfluoreszenztechnik mit Anti-T_{Ah} in der Literatur als empfindlichste Methode zum Nachweis einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten beschrieben wird (38,41,73,79,120).
Der T-Antigennachweis sollte unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgen, um eine Neuraminidasewirkung in vitro zu vermeiden (41).

Das Anti-T_{Ah} Erythrozytengemisch wird nach FISCHER und POSCHMANN auf Glastüpfelplatten oder Objektträgern angesetzt und nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur makroskopisch abgelesen (38,41). LUTHER u.a. hielten die Durchführung des Tests auf U-förmigen Mikrotiterplatten am geeignetsten (88).

In der vorliegenden Untersuchung wurden ebenfalls U-förmige Mikrotiterplatten verwendet, da erstens mit dem Mikrotitergerät exakte und schnelle Verdünnungsreihen hergestellt werden konnten, zweitens in den Mikrotiterplatten ein dreimaliges Waschen vor Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Zugabe möglich war und drittens die Mikrotiterplatten ein exaktes mikroskopisches Ablesen ermöglichten.
Die Inkubationsdauer des Reaktionsgemischs wurde in der Literatur mit 30 Minuten (88) und 10 Minuten (38) bei Raumtemperatur beschrieben. Da unter dem beschriebenen Vorgehen nach 10-15 Minuten keine zusätzlichen Agglutinationen auftraten und von POSCHMANN nach Ablauf dieser Zeit vermehrt unspezifische Reaktionen beobachtet werden konnten (126), wurden die Ergebnisse regelmäßig nach

10 Minuten Inkubation mikroskopisch abgelesen.

Zusätzlich zum Anti-T_{Ah} Test führten wir Untersuchungen mit Anti-Erdnuß-Lectin Globulin vom Kaninchen durch (indirekter Anti-T_{Ah} Test). Dadurch konnten Antigen-Antikörperreaktionen, die zu keiner Agglutination geführt haben, sichtbar gemacht werden.
Das Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Testreagenz wurde bisher nur für Immunfluoreszenzuntersuchungen von T-Antigenen und nicht für den Hämagglutinationsnachweis von T-Antigenen verwendet.
Vor Zugabe des Anti-Erdnuß-Lectin Globulin wurden die Erythrozyten in der Mikrotiterplatte dreimal gewaschen, da das Anti-Erdnuß-Lectin Globulin freies, nicht an T-Antigen gebundenes Anti-T_{Ah} neutralisieren kann und damit die Agglutination verhindert.

Nach FISCHER und POSCHMANN ist dieses empfindliche System zum agglutinatorischen Nachweis von T-Rezeptoren nicht unumstritten (37,122), weil Agglutinationen durch unspezifische Artreaktionen auftreten können. In den ersten Versuchen traten bei den Negativkontrollen mit O-Blutspendererythrozyten nach Zugabe von Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Agglutinationen auf, so daß das Anti-Erdnuß-Lectin Globulin vom Kaninchen durch Absorption mit nativen menschlichen ABO Erythrozyten von heterophilen Artantikörpern gegen Humanerythrozyten befreit werden mußte.
Um unspezifische Agglutinationen durch bakterielle Verunreinigungen zu verhindern, wurde dem Anti-T_{Ah} Reagenz und dem Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Reagenz 0,02 %iges NaN_3 zugesetzt.

Durch dieses Vorgehen konnte das Auftreten unspezifischer Reaktionen nahezu vermieden werden.

Sind T-Antigene am Erythrozyten durch Neuraminidase demaskiert, so besteht die Möglichkeit, daß bereits T-Agglutinine an das T-Antigen gebunden sind. Da sich mit T-Agglutinin beladene T-Antigene durch den Anti-T_{Ah} Suchtest nicht erfassen lassen und zu falsch-negativen Ergebnissen führen, wurde zusätzlich der direkte Coombstest durchgeführt.

Bei einem positiven direkten Coombstest kann es sich nach FISCHER und POSCHMANN um eine Reaktion des Anti-T im Coombsserum mit dem durch Neuraminidase freigelegten Kryptantigen T und nicht um eine Globulin-Antiglobulin Reaktion handeln (37,38,70). Diese positive Reaktion kann von einer echten Antiglobulinreaktion durch den Antiglobulin-Neutralisationstest unterschieden werden. Die Zugabe einer gleichen Menge verdünntem AB-Serum (1:5 in isotonischer NaCl-Lösung) zum Coombsserum neutralisiert die Antiglobuline und führt so zu einem negativen Coombstest. Ein positiver Coombstest durch T-Agglutinine wird dadurch in seiner Reaktionsfähigkeit nicht beeinflußt (37,38).
Da für beide Agglutinationen demaskierte T-Kryptantigene Voraussetzung für einen positiven Coombstest sind, wurde auf diese Differenzierung verzichtet. Ein positiver Anti-T_{Ah} Test in Verbindung mit einem positiven Coombstest läßt auf eine Reaktion des Anti-T im Coombsserum mit dem durch Neuraminidase freigelegten T-Antigenen schließen, währenddessen ein negativer Anti-T_{Ah} Test und ein positiver Coombstest eher eine Globulin-Antiglobulinreaktion vermuten lassen.

Zusätzlich wurden Patientenerythrozyten mit Neuraminidase inkubiert, um die Möglichkeit auszuschließen, daß T-Antigene bei Neuraminidasewirkung nicht demaskiert werden. Denkbar wäre zum Beispiel auch, daß ein freigelegtes T-Antigen zwar vom Agglutinin gebunden wird, dieses aber wiederum durch eine von Staphylokokken freigesetzte Substanz blockiert wird, so daß der direkte Coombstest negativ verliefe (7).

Bei allen Agglutinationsversuchen zur Bestimmung einer T-Antigenfreilegung wurden positive und negative Kontrollen mitgeführt. Eine Wertung der Ergebnisse erfolgte nur bei mikroskopisch völlig agglutinationsfreien Negativkontrollen und bei Positivkontrollen mit einer Agglutination bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 64, so daß eventuelle Störfaktoren als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnten.

Methode zur Bestimmung der Neuraminidaseaktivität

Zur Untersuchung, ob eine T-Antigenfreilegung neuraminidaseinduziert war, wurde die Neuraminidaseaktivität und der Neuraminidasesäuregehalt im Serum bestimmt. Mit der einfacheren quantitativen Bestimmung der Neuraminsäure mit Bial'schem Orcinreagenz werden bei pathologischen Seren häufig Störungen durch andere Substanzen, insbesondere durch Kohlenhydrate, beobachtet (20). Nach UHLENBRUCK ist diese Methode in Ausnahmen, bei denen Zellen ohnehin einen niedrigen Neuraminsäuregehalt haben, unbrauchbar (159).

Zusätzlich muß bei weiteren T-Antigenfreilegungen (z.B. T_n), die nicht durch Neuraminidase bedingt sind, ebenfalls mit erniedrigten Neuraminsäurewerten gerechnet werden (10,12), so daß als umfassende Bestimmung die Thiobarbituratmethode nach WARREN und AMINOFF vorgezogen wurde. Mit dieser Methode wurde als Maß für die Aktivität der Neuraminidase die Konzentration der vom Fetuin freigesetzten N-Acetyl-Neuraminsäure bestimmt.

Da Neuraminidasen sehr labil sind und ganz besonders, wenn sie in starken Verdünnungen vorliegen, sollten die Enzymaktivitäten, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sofort nach dem Auftauen bestimmt werden (28).

Bei 0^{o} C besteht ca. 1/10 der ursprünglichen optimalen 37^{o} C Fermentwirkung (91), und selbst in tiefgekühlten Proben konnten enzymatische Reaktionen beobachtet werden (91). Bei jedem Einfrieren und Auftauen muß mit einem Verlust der Neuraminidaseaktivität von 10-15 % gerechnet werden (137). Nach SCHAUER ist die Neuraminidaseaktivität in gefrorenem Zustand nur ca. drei Monate haltbar (137). Eine Aktivitätssteigerung bzw. Stabilisierung von Neuraminidase kann durch Zugabe von Ca^{++}- Ionen, teilweise auch durch Co^{++}- und Mg^{++}-Ionen erreicht werden (1,28,31,32,33,34,59, 60,131), entsprechend entsteht durch EDTA eine Aktivitätsabnahme (1,31,59,60).

Wie bei anderen photometrischen Bestimmungsverfahren sind auch bei dieser Methode Interferenzen durch verschiedene Substanzen zu beobachten. Es entstehen beispielsweise durch einige ungesättigte Lipide oder 2-Desoxyribose nach Zugabe von Perjodat Malonaldehyd, das mit Thiobarbituratsäure einen roten Farbkomplex mit einem ähnlichen Absorptionsspektrum bildet (77).
Substanzen mit hohem Molekulargewicht und anionischen Eigenschaften sind äußerst wirksame Inhibitoren, vor allem der viralen Neuraminidase (30,31, 34,130). Zu diesen sogenannten Polyanionen gehören Heparin, Dextransulfat, carboxylhaltige Anionen (Mucine) sowie RNS und DNS. Außerdem wurden Lipasekonzentrationen (32), erhöhte Harnstoffwerte (99) sowie Na-Pyruvat und Ca-Citrat als Inhibitoren beobachtet (129,130). Die für die Messung der Neuraminidaseaktivität entscheidende Neuraminsäure kann durch das Enzym Acyl-Neuraminat-Pyruvat-Lyase metabolisiert werden, so daß eine verminderte Neuraminidaseaktivität gemessen wird (34,77,103, 104,132). Dieses Enzym wird von einigen Bakterien mit hoher Neuraminidaseaktivität gebildet (103), so daß nicht in allen Fällen eine exakte quantitative Aussage getroffen werden kann. Eine Korrektur ist durch eine zweite Thiobarbituratsäurebestimmung mit vorgegebener N-Acetylneuraminat Konzentration möglich (77).

Zusätzlich kann eine Neuraminidaseaktivität durch Substanzen mit ähnlichen Extinktionsmaxima wie DNA, Hämoglobin und Lipide vorgetäuscht werden (28). Hohe Neuraminidaseaktivitäten bei hohen Hämoglobinwerten und negativem Anti-T_{Ah} Test wür-

den auf vorgetäuschte Neuraminidaseaktivitäten deuten. Die Bestimmung des Serum-Hämoglobins wurde daher durchgeführt, um zum einen die durch T-Antigenfreilegung induzierte Hämolyse zu messen und zum anderen diese vorgetäuschten Neuraminidaseaktivitäten auszuschließen.

Methode zur Bestimmung des Serum-Hämoglobins

Bei der Bestimmung des Serum-Hämoglobins nach der Farbreaktion von SCHMIDT, STUNKAT und HELLER sind keine Interferenzen bekannt, die den Hämoglobingehalt erhöhen oder erniedrigen können (61).

5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse zeigten, daß bei Intensivpatienten mit septischen Temperaturen und klinischem Infektionsherd in einem relativ hohen Prozentsatz T-Antigenfreilegungen am Erythrozyten in unterschiedlichem Ausmaß vorliegen.
Von 60 Patienten konnte bei zwei Patienten mit dem direkten Anti-T_{Ah} Test eine T-Antigenfreilegung am Erythrozyten nachgewiesen werden (siehe Fallbeschreibung S.38). Zusätzlich zeigten mit dem Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Test 10 Patienten Agglutinationen bis zu einem Anti-T_{Ah} Titer von 128 und 5 Patienten schwache Agglutinationen mit einem Anti-T_{Ah} Titer von 1.
Bei diesen 15 Patienten war mit dem herkömmlichen Anti-T_{Ah} Testreagenz auch unter mikroskopischer

Betrachtung keine Agglutination erkennbar.
Nach wiederholten Blutentnahmen konnten bei insgesamt 43 Patienten auch mit der erweiterten Testmethode keine T-Demaskierung am Erythrozyten festgestellt werden.
Eine T-Kryptantigenfreilegung wurde hauptsächlich bei polytraumatisierten Patienten mit pleuropulmonalen Herden und bei Patienten mit Peritonitiden nach abdominalchirurgischen Eingriffen beobachtet.

Diese nachgewiesenen T-Antigendemaskierungen am Erythrozyten können verschiedene Ursachen haben. Das Anti-T_{Ah} Testreagenz kann außer den ß-D-Galaktosido (1-3) und N-Acetyl-D-Galaktosamin T-Antigenrezeptoren zusätzlich mit anderen Substanzen zur Agglutination führen (115).
Neben dem neuraminidasedemaskierten T_F-Friedenreich Antigen wurden inzwischen weitere T-Antigene (T_K, T_h, T_n) entdeckt, die offenbar durch andere, bisher unbekannte Enzyme freigelegt werden (10,12, 13,14,113). Die beiden Kryptantigene T_K und T_h werden wie das T_F-Antigen durch Erdnuß-Lectin agglutiniert (14). Eine Differenzierung kann durch andere Lectine aus Pflanzensamen erfolgen (14) oder durch Bestimmung der Neuraminidaseaktivität im Serum, die bei keiner der drei anderen T-Antigenfreilegungen erhöht ist. Damit kann festgehalten werden, daß positive Agglutinationsreaktionen der Erythrozyten mit Anti-T_{Ah} nicht unbedingt die Gegenwart von bakteriellen Neuraminidase indizieren müssen (124).

In der vorliegenden Untersuchung kann damit teilweise eine Erklärung für T_{Ah}-positive Patienten ohne erhöhten Neuraminidasespiegel gefunden werden

(siehe Abbildung 4). Dies trifft ganz besonders für Patienten 11, 12, 16, 17 zu, die nie erhöhte Neuraminidaseaktivitäten aufzeigten.

Eine weitere Ursache für das Auftreten von T-Antigenen bieten Befunde SPRINGERs bei Karzinompatienten, der T-spezifische Antigene (T_F und T_n) an Zellmembranen von Brust-, Colon- und Magenkarzinomen, jedoch nicht im gesunden Gewebe fand (145,147,148, 149). T_n-Antigene sind biosynthetische Vorstufen des Thomsen-Friedenreich Antigens (T_F) und dieses ist wiederum Vorstufe von M und N Antigenen (T_n -> T_F -> N -> M) (29,64,145,148,149). Blutgruppenantigene M und N lassen sich sowohl in gesundem wie in karzinösem Gewebe nachweisen. Die T_F und T_n Eigenschaften in Karzinomen deuten auf eine inkomplette oder zerstörende Antigenbiosynthese in Krebsgeweben, die durch Transferase Abnormalitäten oder der Verlust von Endgruppen durch hyperaktive Glykosidasen verursacht sein können (149). Anti-T_F und Anti-T_n Agglutinine, die in jedem Erwachsenenserum vorhanden sind, weisen bei Karzinompatienten stark verminderte Titer auf (145,146,148). 85 % der Patienten mit vermindertem Anti-T Gehalt im Blut leiden an Malignomen (146).

Von den T_{Ah} positiven Patienten (2,12,16) (siehe Abbildung 4 + 5) waren drei Patienten an Adenokarzinomen (Rectum und Magen) erkrankt. Auffallend ist, daß die Patienten 12 und 16 mehrmals starke Agglutinationen und stark erhöhte Serum Hb-Werte aufzeigten und dabei keine erhöhten Neuraminidaseaktivitäten festzustellen waren.
Diese Befunde könnten in Anlehnung an BIRD eine T_k oder T_h Kryptantigenfreilegung vermuten lassen (14).

Um sämtliche nicht durch Neuraminidase induzierten T-Antigenfreilegungen auszuschließen, wurde zu jedem Anti-T_{Ah} Agglutinationstest die Neuraminidaseaktivität im Serum bestimmt.
Mit dem Bial'schen Orcinreagenz konnten bei verschiedenen Patienten mit demaskierten T-Antigenen erniedrigte Neuraminsäurewerte festgestellt werden. Dies zeigte, daß Neuraminidase vorhanden war und gebundene Neuraminsäure abgespalten hat, so daß die jetzt freien Neuraminsäuren durch andere Enzyme wie N-Acetyl-Neuraminat-Lyase oder N-Acetyl-Neuraminsäure Aldolase weiter aufgespalten werden können und der N-Acetyl-Neuraminsäuregehalt auf das Gesamtvolumen an Neuraminsäuren bezogen erniedrigt wird (90).
Mit der Thiobarbituralmethode ergaben sich als Maß für die Neuraminidaseaktivität im normalen Serum $\bar{x}$= 8,84 µMol/l ± s=1,98.

Es existieren sehr unterschiedliche Berichte darüber, ob Neuraminidase im normalen Serum vorhanden ist oder nicht. WARREN und SPEARING (165) wiesen zum ersten Mal Neuraminidaseaktivität im normalen Serum nach, obwohl damals eine bakterielle Kontamination dieser Seren offenbar nicht ausgeschlossen war (28).
RODRIGUEZ (133) konnte mit einer von GREGORIADIS (54) beschriebenen Methode im normalen Serum keine Neuraminidaseaktivität feststellen, während SCHAUER (137) ebenfalls in neueren Untersuchungen mit einer radioaktiven Bestimmung Neuraminidase im Serum nachweisen konnte.

Bei beiden Anti-T_{Ah}positiven Patienten (1 + 2) lagen stark erhöhte Neuraminidaseaktivitäten vor (63 µMol/l und 27 µMol/l). Von 10 Patienten mit Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Agglutinationen bis zu einem Titer von 128 ließen sich bei 8 Patienten erhöhte Neuraminidasespiegel nachweisen, während bei den 5 Anti-Erdnuß-Lectin positiven Patienten mit dem Agglutinationstiter von 1 nur bei 2 Patienten vereinzelt erhöhte Neuraminidaseaktivitäten vorlagen.
Es kann demnach von 17 T-Antigenpositiven Patienten bei 12 Patienten eine neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden. Für Agglutinationen, die mit keiner Neuraminidaseaktivitätserhöhung korrelierten, können entweder die auf Seite 58 ff aufgeführten mit Neuraminidase interferierenden Inhibitoren verantwortlich sein oder es liegen andere nicht durch Neuraminidase bedingte T-Antigenfreilegungen vor (siehe Seite 62 ff).

Neuraminidaseaktivitätserhöhungen entstehen durch Infektionen mit neuraminidaseproduzierenden Mikroorganismen. Zahlreiche pathogene Neuraminidasebildner sind typische Wundkeime und Sepsiserreger (102,106).
Zu diesen klassischen Sepsiserregern bei Menschen gehören vergrünende Streptokokken, Pneumokokken, Pseudomonas, Bacteroides sowie Clostridien.
Typische Wundkeime sind Enterokokken, Pseudomonas, Bacteroides, Clostridien, Corynebakterien sowie Streptomyces albus und Sporothrix schenckii (27, 102,106).

Ein exakter Erregernachweis wurde durch antibiotische Behandlung nahezu aller Patienten erschwert. Von 17 T-Antigen positiven Patienten erfolgte bei 13 Patienten (77 %) der Nachweis neuraminidaseproduzierender Bakterien (siehe Tabelle 4). Bei den vier weiteren T-Antigen positiven Patienten können neuraminidaseproduzierende Bakterien durch Mischflora überdeckt worden sein.

Bei 21 Blutkulturen aller Patienten konnte kein Nachweis neuraminidaseproduzierende Keime erbracht werden. Dies spricht nicht gegen eine in vivo T-Agglutination, da Bakterien nicht im Blutstrom sein müssen, sondern ihre Enzyme nach Absorption von einem entzündeten Herd in den Blutstrom gelangen können (11). Eine neuraminidaseinduzierte T-Demaskierung könnte demnach bereits im Vorstadium einer Bakteriämie oder einer Sepsis mit dem Anti-T_{Ah}- und dem Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Testreagenz erkannt werden.
Unter neuraminidasefreisetzenden Bakterien konnten Bacteroides Spezies, Enterokokken und Pseudomonas mehrfach isoliert werden (siehe Tabelle 3). Bacteroides Keime wurden bis auf eine Ausnahme nur bei T-Antigen positiven Patienten isoliert. Nach MÜLLER produzieren nahezu alle Bacteroides Arten hohe Neuraminidaseaktivitäten (103), während HAMMAN berichtet, daß viele intestinale Bacteroides keine oder nur geringe Aktivitäten aufweisen (57). Enterokokken, die unregelmäßige meist schwache Neuraminidaseaktivitäten produzieren, konnten bei Patienten mit demaskierten T-Antigen viermal so häufig isoliert werden als bei T-Antigen negativen Patienten (siehe Tabelle 3). Der Nachweis einer Neuraminidasebildung bei Pseudomonas aeruginosa

Keimen ist sehr zweifelhaft (102,103) und konnte seit SHILO 1959 (142) nicht mehr bestätigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse deuten ebenfalls auf keine oder auf sehr unregelmäßige Neuraminidase-aktivitäten bei Pseudomonas aeruginosa.

Neuraminidasen sind nur dann pathogen, wenn das Enzym in excessiven Mengen auf den Wirtsorganismus wirkt und hohe Aktivitäten aufweist (102,106). Zwischen dem Grad der Neuraminidasebildung und der Virulenz bei verschiedenen Bakterien bestehen enge Korrelationen (80,81).

Die von Mikroorganismen freigesetzte Neuraminidase schädigt durch Abspaltung von N-Acetyl-Neuraminsäure und Demaskierung von T-Antigenen Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten (111), Plasmaproteine und Endothelien mit den Folgen von Hämolyse, Thrombozytopenien, Hämorrhagischer Diathese und akutem Nierenversagen. Die Schädigung dieser verschiedenen Zelltypen erfolgt meistens nicht gleichzeitig und hängt von der Menge der gebildeten Neuraminidase und ihrer Enzymaktivität ab. Erst nach Alteration der Plasmaproteine tritt eine Schädigung der Erythrozytenmembran ein, die nach mehreren Tagen zur Hämolyse führt (121).
Die Hämolyse kann zum einen auf direkte Erythrozytenmembranschädigung einschließlich der Reaktion mit Anti-T, zum anderen auf menschliche Erythrozytendestruktion infolge Intimaschädigung und Fibrinablagerungen zurückgeführt werden (122). Zusätzlich führt der Verlust an negativen Oberflächenladungen durch Abspaltung von N-Acetyl-Neuraminsäure zu einem vermehrten Abfangen der Erythrozyten im RES und damit zu einer stark verkürzten

Überlebenszeit, die bis auf 1/4 der normalen Zeit angegeben wird (38,41,54,69,70,113,116).

Zur Beurteilung einer Hämolyse wurde bei allen Patienten freies Hämoglobin im Serum bestimmt. Zwischen einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten und dem Auftreten einer Hämolyse ergab sich ein hochsignifikanter Zusammenhang (siehe Ergebnisse). Beide Patienten mit Anti-T_{Ah} T-Antigennachweis zeigten stark erhöhte Serum Hb-Werte. Von 10 Anti-Lectin T_{Ah} stark positiven Patienten konnte bei 8 eine Hämolyse festgestellt werden, dabei korrelierten von 30 Probeergebnisse 20 mit einer Serum Hb-Erhöhung.
Nach FISCHER und POSCHMANN kann neben stark geschädigten Erythrozyten, die schnell abgebaut werden, eine zweite Population auftreten, die aufgrund der schwachen T-Demaskierung eine normale Überlebenszeit aufweisen (38,120,125). Da mit dem herkömmlichen Anti-T_{Ah} Test bereits demaskierte T-Antigene nachgewiesen werden können, die im Organismus noch zu keiner Hämolyse geführt haben (125), liegt nahe, daß bei schwachem T-Antigennachweis mit Anti-Erdnuß-Lectin Globulin keine erhöhten Serum Hb-Werte nachzuweisen sind.
Bei T-Antigen negativen Patienten wurden von 105 Serumproben fünfmal erhöhte Serumwerte gemessen. Da andere mikrobielle Toxine ebenfalls zu Hämolysen führen können, muß ein fehlender T-Kryptantigennachweis eine Hämolyse nicht ausschließen (41). Zusätzlich können mechanische Hämolysen durch Blutentnahmen, Bluttransfusionen und bei einigen Patienten durch Hämodialyse entstanden sein.

Eine Schädigung der Gefäßendothelien ist nur durch besonders hohe Enzymaktivitäten möglich und wurde bisher nur in Zusammenhang mit dem HUS an Nierenkapillarendothelien nachgewiesen (41,121,122).
Die Pathogenese des ANV beim HUS kann mit der Bildung intrakapillärer und intraarterieller Fibrinthromben und ausgedehnten Fibrinablagerungen mit Nierenrindennekrosen erklärt werden (121).
Von 17 T-Antigen positiven Patienten entwickelte sich bei 5 Patienten (2 Patienten mit dem direkten Anti-T_{Ah} Test positiv +++ und 3 Patienten mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test positiv ++) ein dialysepflichtiges ANV, das bei keinem Patienten auf ein hämorrhagisches Schockgeschehen zurückgeführt werden konnte. Das Nierenversagen trat in 4 von diesen 5 Fällen im Anschluß an eine nachgewiesene T-Antigendemaskierung am Erythrozyten auf.

Von 43 T-Antigen negativen Patienten entwickelten sich nur in zwei Fällen ein ANV, das jeweils auf ein hämorrhagisches Schockgeschehen zurückgeführt werden konnte. Zwischen dem Auftreten von demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten und dem Auftreten eines ANV konnte somit ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Da viele Patienten im akuten Lungenversagen versterben und deren Ätiologie häufig noch ungeklärt ist, stellte sich für uns die Frage, ob Neuraminidase außer einer Nierenendothelschädigung zu einer Schädigung der Lungenstrombahn führen kann.
Es konnte bisher in zahlreichen Untersuchungen zwischen dem Auftreten einer Sepsis und dem Auftreten einer pulmonalen Insuffizienz ein enger Zusammen-

festgestellt werden (15). Als eine der auslösenden Ursachen für das infektionsbedingte ARDS gilt heute das Endotoxin gramnegativer Bakterien (2). SEGER fand interessanterweise bei zwei Kindern mit neuraminidaseinduziertem HUS intravasale Fibrinthromben sowohl in den Nieren als auch in der Lunge (139).
Nach den Kriterien von PONTOPPIDAN (118) wurden in unseren Untersuchungen von 17 T-Antigen positiven Patienten bei 8 Patienten ein ARDS diagnostiziert, und von 43 T-Antigen negativen Patienten lag bei 5 Patienten ein ARDS vor.

Es ergab sich bei diesen Intensivpatienten mit Infektionsherden ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten und dem Auftreten von demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten und dem Auftreten eines ARDS.

Schlußfolgerung

Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß bei der Pathogenese der Hämolyse, des akuten Nierenversagens und des akuten Lungenversagens bei schwerkranken Patienten mit septischen Infektionsherden die neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung eine wesentliche Rolle spielen könnte.

Es erscheint daher sinnvoll, bei allen Patienten mit schweren Infektionen, insbesondere mit pleuropulmonalen Prozessen und Peritonitiden unabhängig von einer Hämolyse nach einer T-Antigenfreilegung am Erythrozyten mit dem direkten Anti-T_{Ah} und dem indirekten Anti-T_{Ah} Test zu suchen. Da eine Hämolyse sowie eine Schädigung der Endothelien häufig erst nach einer Latenz von mehreren Tagen auftreten, können durch intensive Suche nach einem neuraminidasefreisetzenden Erreger, antibiotischer Behandlung und prophylaktischer Heparinisierung häufig schwere Komplikationen (HUS) umgangen werden.

Da Neuraminidasen nach Absorption von einem Infektionsherd in den Blutstrom gelangen, kann mit dem Anti-T_{Ah} und dem Anti-Erdnuß-Lectin Globulin Testreagenz eine neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung bereits im Vorstadium einer Bakteriämie oder einer Sepsis diagnostiziert werden. Der direkte und der indirekte Anti-T_{Ah} Hämagglutinationstest kann demnach bei der Suche nach einem septischen Herd durch das frühzeitige Erkennen einer Infektion Vorteile gegenüber den herkömmlichen Blutkulturnachweisen bieten. Dies trifft insbesondere für die zunehmenden Infektionen durch

neuraminidasefreisetzende Anaerobier zu. Da jedoch nur ein kleiner Teil aller Mikroorganismen Neuraminidase produzieren, sind die Anwendungsmöglichkeiten dieser Hämagglutinationsteste zur Diagnostik von Bakteriämien und Sepsis eingeschränkt.

Da sich zwischen dem Auftreten einer T-Demaskierung am Erythrozyten und dem Auftreten eines akuten Nierenversagens und eines akuten Lungenversagens ein signifikanter Zusammenhang zeigte, wäre es wünschenswert, weitere Untersuchungen in Bezug auf die Nieren- und Lungenstrombahn mit der Immunfluoreszenzmethode durchzuführen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Neuraminidase, ein Enzym, das von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen gebildet wird, spaltet N-Acetyl-Neuraminsäure von Erythrozyten- und anderen Zellmembranen ab und legt dadurch T-Kryptantigene frei (Thomsen-Friedenreich-Antigene).
Demaskierte T-Kryptantigene können mit dem im normalen Serum vorhandenen Anti-T-Agglutinin reagieren und zur Hämolyse führen.
Es wurden bisher zahlreiche septische Infektionen mit neuraminidaseinduzierten hämolytischen Anämien beobachtet. Zusätzlich spielt Neuraminidase als pathogenetischer Faktor beim hämolytisch urämischen Syndrom (HUS) bei Kindern eine wesentliche Rolle. Hierbei wurden erstmals demaskierte T-Antigene an Kapillarendothelien der Nierenglomeruli mit den Folgen eines akuten Nierenversagens nachgewiesen.

Bei 64 schwerkranken Intensivpatienten mit septischen Temperaturen und nachgewiesenem Infektionsherd wurde in einer Screening-Untersuchung nach demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten gesucht. Dies erfolgte durch positive Agglutination mit Erdnuß-Lectin (Arachis hypogaea) Anti-T_{Ah} (direkter Anti-T_{Ah} Test) und durch den indirekten Hämagglutinationstest mit Anti-Erdnuß-Lectin Globulin vom Kaninchen.
Bei 17 Patienten wurden demaskierte T-Antigene am Erythrozyten nachgewiesen, davon traten bei 2 Patienten mit dem direkten Anti-T_{Ah} Test, bei 10 Patienten mit dem indirekten Anti-T_{Ah} Test Agglutinationen mit einem Anti-T_{Ah} Titer $\leq$ 128 auf und bei 5 Patienten Agglutinationen mit einem Titer 1.

Mit der Thiobarbituratmethode wurden bei 10 dieser 17 T-Antigenpositiven Patienten erhöhte Neuraminidaseaktivitäten nachgewiesen, so daß in diesen Fällen eine neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung angenommen werden konnte.

Als Ursache wurden bei 77 % der T-Antigenpositiven Patienten der Nachweis neuraminidasefreisetzender Mikroorganismen erbracht (Bacteroides, Enterokokken, Pseudomonas). Pneumonien und Peritonitiden konnten am häufigsten als Infektionsquelle beobachtet werden.

Bei allen Patienten wurde freies Hämoglobin im Serum bestimmt; so konnte zwischen dem Auftreten von demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten und der Folge einer Hämolyse ein hochsignifikanter Zusammenhang gezeigt werden ($p=0,01$).
Von 17 T-Antigenpositiven Patienten trat bei 12 eine Hämolyse ein, während von 43 T-Antigennegativen Patienten nur bei 5 eine Hämolyse vorlag.

Zusätzlich zeigte sich, daß Patienten mit demaskierten T-Antigenen am Erythrozyten signifikant häufiger ein akutes Nierenversagen und ein akutes Lungenversagen (nach PONTOPPIDAN) entwickelten.

Eine neuraminidaseinduzierte T-Antigenfreilegung spielt demnach bei septischen Intensivpatienten im Erwachsenenalter eine wesentliche Rolle und ist möglicherweise an der Entstehung des akuten Nieren- und Lungenversagens beteiligt.

7. TABELLEN

Tabelle 5

Testpositive Patienten

Patienten	Hämolyse	ANV	ARDS	Pneumonie	Peritonitis	Mortalität	Anti-T Ah Titer
1 Polytrauma	+	+	+	+	-	+	+++
2 Rectum-Ca	+	+	-	-	+	+	+++
3 Polytrauma	+	+	+	+	-	-	++
4 Postpart. Blutung	+	+	-	+	+	+	++
5 Polytrauma	+	-	-	-	-	-	++
6 Polytrauma	+	-	+	+	-	-	++
7 Abdom.chir.E.	+	+	+	+	+	+	++
8 Kardio.chir.E.	+	-	-	-	-	-	++
9 Polytrauma	-	-	+	+	-	+	++
10 Abdom.chir.E.	-	-	-	-	+	+	++
11 Abdom.chir.E.	+	-	-	-	+	+	++
12 Abdom.chir.E.	+	-	-	+	-	-	++
13 Dek.Leberz.	+	-	+	+	-	-	+
14 Polytrauma	+	-	+	-	-	-	+
15 Polytrauma	-	-	-	+	-	-	+
16 Abdom.chir.E.	-	-	+	+	+	-	+
17 Aspirations-pneumonie	-	-	-	-	-	-	+
Insgesamt	12	5	8	10	6	7	

Tabelle 6

Testnegative Patienten

Patienten	Hämolyse	ANV	ARDS	Pneumonie	Peritonitis	Mortalität	Anti-T$_{Ah}$ Titer
1 Polytrauma	-	-	+	-	-	+	-
2 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
3 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
4 Polytrauma	-	-	+	-	-	-	-
5 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
6 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
7 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
8 Polytrauma	+	-	-	-	-	-	-
9 Polytrauma	-	-	-	+	-	-	-
10 Polytrauma	-	-	-	-	-	+	-
11 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
12 Polytrauma	-	-	-	+	-	+	-
13 Polytrauma	-	-	-	-	-	-	-
14 Polytrauma	-	-	-	-	-	+	-
15 Polytrauma	-	-	-	+	-	+	-
16 Polytrauma	-	-	-	+	-	+	-
17 Polytrauma	+	+	-	+	-	-	-
18 Polytrauma	-	-	-	+	-	-	-
19 Abdom.chir.E.	-	-	-	-	+	-	-
20 Abdom.chir.E.	-	-	-	-	+	+	-
21 Abdom.chir.E.	-	-	+	+	+	+	-
22 Abdom.chir.E.	-	-	-	-	+	+	-
23 Abdom.chir.E.	+	-	-	+	-	+	-
24 Abdom.chir.E.	-	-	-	+	-	+	-
25 Neurochir.E.	-	-	-	-	-	+	-
26 Neurochir.E.	-	-	-	+	-	+	-
27 Neurochir.E.	-	-	-	-	-	-	-
28 Neurochir.E.	-	-	-	-	-	+	-
29 Kardiochir.E.	-	-	-	-	-	+	-
30 Kardiochir.E.	-	+	+	-	-	+	-
31 Kardiochir.E.	-	-	-	-	-	-	-
32 Sonstige	-	-	-	-	-	-	-
33 Sonstige	+	-	-	-	-	-	-
34 Sonstige	-	-	+	+	-	-	-
35 Sonstige	+	-	-	-	-	-	-
36 Sonstige	-	-	-	-	-	-	-
37 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
38 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
39 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
40 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
41 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
42 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
43 Unklare Sepsis	-	-	-	-	-	-	-
Gesamt	5	2	5	11	4	16	

8 LITERATURVERZEICHNIS

1 ADA,G.L.; FRENCH,E.L.; LIND,P.E.
Purification and properties of neuraminidase of V.cholerae
J gen Micr 24,409-425 (1961)

2 AHNEFELD,F.W.; BERGMANN,H.; BURRI,C.; DICK,W.; HALMAGYI,M.; HOSSLI,G.; RÜGHEIMER,E.
Akutes Lungenversagen
Klinische Anästhesiologie und Intensivtherapie
Springer Verlag, Berlin (1979)

3 AMINHOFF,D.
The determination of free sialic in the presence of the bound compound
Virol 7,355-357 (1959)

4 AMINHOFF,D.
Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids
Biochem J 81,384-392 (1961)

5 ARDEN,S.B.; CHANG,W.H.; BARKSDALE,L.
Distribution of neuraminidase and N-Acetylneuraminatelyase activities among corynebacteria, mycobacteria and nocardias
J Bact 112,1206-1212 (1972)

6 ARNDT-HANSER,A.
Coombs-Fibel
Sonderheft 3
Biotest Mitteilungen Nov.80

7 BARON,D.
Mündliche Mitteilungen (1981)

8 BIRD,G.W.G.
Anti-T in Peanuts
Vox Sang 9,748-749 (1964)

9 BIRD,G.W.G.
The Red Cell
Br Med J 1,293-297 (1972)

10 BIRD,G.W.G.
Membrane abnormalities in polyagglutinable erythrocytes
Acta haemat 47,193-199 (1972)

11 BIRD,G.W.G.
Complexity of erythrocyte polyagglutinability
In: Human Blood Groups
Proceedings of the 5th International Convocation on Immunology
Grand Island, N.Y.S.
Karger, Basel 1977

12 BIRD,G.W.G.; SHINTON,N.K.; WINGHAM,J.
Persistent mixed-field polyagglutination
Br J Haem 21,443-453 (1971)

13 BIRD,G.W.G., WINGHAM,J.; BECK,M.L.; PIERCE,S.R.; OATES,G.D.; POLLOCK,A.
Th, a new form of erythrocyte polyagglutination
Lancet June 3, 1215-1216 (1978)

14 BIRD,G.W.G.; WINGHAM,J.
Vicia cretica: a powerful lectin for T and Th - but not TK - or other polyagglutinable erythrocytes
J Clin Path 34, 69-70 (1981)

15 BLAISDELL,F.M.; LEWIS,F.R.
Respiratory distress syndrome of shock and trauma: Post traumatic respiratory failure
W.B.Saunders Company (1977)

16 BLIX,F.G.; GOTTSCHALK,A.; KLENK,E.
Proposed nomenclature in the field of neuraminidase and sialic acids
Nature 179, 1088-1088 (1957)

17 BLUMBERG,B.S.; WARREN,L.
The effect of sialidase on transferrins and other serum proteins
Biochim biophys A 50,90-101 (1961)

18 BOCCARDI,V.
Anti-T agglutinin in primary malignant blood disease
Blut 28,370-373 (1974)

19 BOCCARDI,V.
Anti-T agglutinin in cirrosis of the liver
Vox Sang 26,83-85 (1974)

20 BÖHM,P.; DAUBER BAUMEISTER
Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum
Klin WS 32,289-292 (1954)

21 BUDDECKE,E.
Grundriss der Biochemie
De Gruyter Verlag, Berlin (1977)

22 BURNET,F.M.; McCREA,J.F.; STONE,J.D.
Modification of human red cells by virus action
Br J Exp Path 27,228-236 (1946)

23 BURNET,F.M.; STONE,J.D.
The receptor destroying enzyme of V.cholerae
Austr.J exp Biol med Sci 25,227-233 (1947)

24 CHOI,Sun-J.V.; SIMONE,J.V.; JOURNEY,L.J.
Neuraminidase induced thrombocytopenia in rats
Br J Haem 22,93-101 (1972)

25 CLAUß,G.; EBNER,H.
Grundlagen der Statistik
Harri Deutsch Verlag, Frankfurt (1975)

26	CRAMPEN,M.; NIKOLAI,H.; ZILLIKEN,F.	Properties and substrate specifities of two neuraminidases from Trichomonas fetus Hoppe-Seylers Zs 360,1703-1712 (1979)
27	DASCHNER,F.	Krankenhausinfektionen in einem Universitätsklinikum DMW 106,101-105 (1981)
28	DERNICK,R.	Schriftliche Mitteilung 1982
29	DESAI,P.R.; SPRINGER,G.	Sialylation of Thomsen-Friedenreich (T) and blood type NM antigens by transferases in human sera measured by NAN uptake J Immunogenet 7,149-155 (1980)
30	DRZENIEK,R.	Inhibition of neuraminidase by polyanions Nature 215,1205-1205 (1966)
31	DRZENIEK,R.	Wechselwirkungen zwischen Myxoviren und Zelloberflächen I und II Z med Mikrobiol Immunol 155,315-351 (1970)
32	DRZENIEK,R.	Wechselwirkungen zwischen Myxoviren und Zelloberflächen III. Neuraminidase der Myxoviren Z med Mikrobiol Immunol 156,1-38 (1970)
33	DRZENIEK,R.	Viral and bacterial neuraminidases Curr Top Microbiol Immunol 59,35-74 (1972)
34	DRZENIEK,R.	Sustrate specificity of neuraminidases Histochem J 5,271-290 (1973)
35	DRZENIEK,R.; SCHARMANN,W.; BALKE,E.	Neuraminidase and N-Acetylneuraminate-pyruvatlyase of Pasteurella multocida J gen Microbiol 72,357 (1972)
36	DUSWALD,K.H.	Immunglobuline bei chirurgischen Patienten Symposium des klinisch-immunologischen Arbeitsbereichs der medizinischen Universitätsklinik Bonn Bonn am 17.Okt.1981
37	FISCHER,K.; POSCHMANN,A.	Nachweis hämolyt. Anämien infolge Neuraminidasewirkung Ärztl Lab 17,115-121 (1971)
38	FISCHER,K.; POSCHMANN,A.; OSTER,H.	Hämolyse bei schwerer Pneumonie infolge Neuraminidasewirkung Ms Kinderheilk Bd.119, Heft 1, 2-8 (1971)

39 FISCHER,A.; POSCHMANN,A.; VONGJIRAD,A.
Neuraminidaseinduzierte Alteration der Erythrozyten und Gefäßendothelien - eine Ursache des hämolytischen-uräm. Syndroms? Vortrag auf dem 16. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie, Bad Nauheim (1972)

40 FISCHER,K.; POSCHMANN,A.
Immunhämolyt. Anämien
In: Bachmann u.a.
Pädiatrie in Praxis und Klinik Bd. II, 1053-1657 (1980)

41 FISCHER,K.; POSCHMANN,A.
Diagnostik immunhämolytischer Anämien
Biotest Serum Institut Frankfurt (1980)

42 FISCHER,K.; POSCHMANN,A.
Autoimmunhämolytische Anämien
Klinik Arzt 4,358-366 (1981)

43 FRASER,A.G.; BROWN,R.
Neuraminidase production by bacteroidaceae
J med Microbiol Vol 14,63-76 (1976)

44 FRIEDENREICH,V.
Fortgesetzte Untersuchungen über bakterielle Umformung der isoagglutinatorischen Verhältnisse der Blutkörperchen im vitro
Acta Med Scand 26,308-320 (1927)

45 FRIEDENREICH,V.
Untersuchungen über das von O.Thomsen beschriebene vermehrungsfähige Agens als Veränderer des isoagglutinatorischen Verhaltens der roten Blutkörperchen
Z Immun Forsch 55,84-101 (1928)

46 FRIEDENREICH,V.
The Thomsen haemagglutination phenomenon
Diss med Copenhagen (1930)

47 FRIEDENREICH,V.
Die Serologische Auffassung des Thomsenschen Blutkörperchenrezeptors
Acta Path Microbiol Scand Suppl V,68-75 (1930)

48 FUHRMANN,G.F.; GRANZER,E.; BEY,E.; RUHENSTROTH-BAUER,G.
Zur Veränderung der Oberflächenladung von Zellmembranen durch chemische und physikalische Einwirkungen
Naturwissenschaften 49,613-621 (1962)

49 GLÖCKNER,W.M.; KAULEN,H.D.; UHLENBRUCK,G.
Immunochemical detection of the Thomsen-Friedenreich antigen (T-antigen) on platelet plasma membranes
ThrombHaemostas 39,186-192 (1978)

50 GOTTSCHALK,A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and vibrio cholerae
Biochem biophys A 23,645-646 (1957)

51 GOTTSCHALK,A.; DRZENIEK,R. Neuraminidase as a tool in structural analysis
BBA Library Vol 5 Part A 2nd (1972)

52 GRAY,J.M.; BECK,M.L.; OBERMAN,A. Clostridial induced type I polyagglutinability with associated intravascular hemolysis
Vox Sang 22,379-383 (1972)

53 GREENBERG,J.; PACKHAM,M.A.; CAZENAVE,D.P. et al. Effects an platelet function of removal of platelet sialic acid by neuraminidase
Lab Investigation 32,376-380 (1976)

54 GREGORIADIS,G.; PUTMAN,D.; LOUIS,L.; NEERUNJUN,D. Comparative effect and fate of nm-entrapped and liposome-entrapped neuraminidase injected into rats
Biochem J 140,323-330 (1974)

55 GROTTUM,K.A.; JEREMIC,M. Neuraminidase injections in rabbits
Thromb Diath Haem 29,461-469 (1973)

56 GSELL,R. Beobachtungen am elektrischen Oberflächenpotential von Erythrozyten nach Einwirkung von Neuraminidase und Anti-Neuraminidase-Seren
Diss med München (1973)

57 HAMMAN,R.; NICOLAI,H.; WERNER,H. Neuraminidasen of bacteroidacae
Zbl Bakt Hyg I Abt Org A 248,526-531 (1981)

58 HARBOE,M.; NATVIG,B. Medizinische Immunologie
übersetzt von D.Baron
Enke Verlag, Stuttgart (1981)

59 HAYANO,S.; TANAKA,A. Streptococcal Sialidase
J Bact 93,1753-1757 (1967)

60 HAYANO,S.; TANAKA,A. Sialidase-like enzymes produces by group A, B, C, G and L streptococci and by streptococous sanguis
J Bact 97,1328-1333 (1969)

61 HELLER Mündliche und schriftliche Mitteilung (1982)

62 HIRST,G.K. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus
Science 94,22-22 (1941)

63 HÜBER,R.; MOND,R. Physikalische Chemie der Blutkörperchen-Sedimentierung
Klin WS 1,2412-2414 (1922)

64 HOWARD,R.D. Expression of T-antigen on polyagglutinable erythrocytes and carcinoma cells: preparation of T-activated erythrocytes Anti-T lectin, anti T-absorbed human serum and purified anti-T antibodies
Vox Sang 37,107-110 (1979)

65 HOWE,C.; McLENNAN,J.D.; MANAL,J.; KABAT,E.A. Enzymes of Clostridium tertium. Effects on blood group and virus receptor substances
J Bact 74,365-365 (1957)

66 HÜBNER,G. Untersuchung über Isoagglutination mit besonderer Berücksichtigung scheinbarer Abweichung vom Gruppenschema
Z Immun Forsch 45,223-248 (1925)

67 HUMMEL,K. Die Bedeutung der elektrischen Ladung menschl. Blutkörperchen bei der Hämagglutination
In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin
Immunhämatologie Bd.2
15 Kongreß Mai 1972 Gießen

68 HÜNIG,S.; FRITSCH,K.H. Justus Liebigs
Ann Chem 609,143-143 (1957)

69 JANCIK,J.; SCHAUER,R.; STREICHER,H. The influenze of membrane-bound N-acetylneuraminic acid on the survival of erythrocytes in man
Hoppe-Seyler Zs 356,1329-1331 (1975)

70 JANCIK,J.; SCHAUER,R. Sequestration of Neuraminidasetreated erythrocytes
Cell Tiss Res 186,209-226 (1978)

71 KANIA,J.; UHLENBRUCK,G.; JANSSEN,E.; KLEIN,P.J.; VIERBUCHEN,M. Isolation, characterization and implications of anti-TF (Thomsen-Friedenreich) agglutinins from different sources
Immunobiol 157,154-168 (1980)

72 KELLY,R.T.; GREIFF,D.; FARMER,S. Neuraminidase activity in Diplococcus pneumoniae
J Bact 91,601-603 (1966)

73	KIM,Z.; UHLENBRUCK,G.	Untersuchungen über T-Antigen und T-Agglutinin Z Immun Forsch 130,88-99 (1966)
74	KIM,Y.D.; PRAKASH,U.	Nature of human serum blood T-antibodies Immun Commun 8 (4),397-406 (1976)
75	KLEIN,P.J.; BULLA,M.; NEWMANN,R.A.; MÜLLER,P.; UHLENBRUCK,G.; SCHÄFER,H.E.; KRÜGER,G.; FISCHER,R.	Thomsen-Friedenreich antigen in haemolytic-uraemic syndrome (letter) Lancet 2,1024-1025 (1977)
76	KLEIN,P.J.; NEWMANN,R.A.; MÜLLER,P.; UHLENBRUCK,G.; SCHÄFER,H.E.; LENNARTZ,K.J.; FISCHER,R.	Histochemical methods for the demonstration of Thomsen-Friedenreich Antigen in cell suspensions and tissue sections Klin WS 56,761-765 (1978)
77	KÖHLER,H.C.	Untersuchungen zur bakteriellen Neuraminidase: Methoden der Aktivitätsbestimmung und Reindarstellung von Clostridium perfringens-Neuraminidase sowie ihr Einfluß auf die Nebenschlußaktivierung der dritten Komplementkomponente Diss med Köln 1980
78	KRÜPE,M.	Die Blutgruppen des Menschen Krüpe, Fulda (1970)
79	KRÜPE,M.	Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper (Phytagglutinine) Enke Verlag, Stuttgart (1956)
80	KRASEMANN,C.; MÜLLER,H.E.	Studies on the virulence and Neuraminidase production of 26 pasteurella strains Behr Inst Mitt Nr.55,140-144 (1974)
81	KRASEMANN,C.; MÜLLER,H.E.	Die Virulenz von Erysipelothrixrhusiopathiae-Stämmen und ihre Neuraminidase-Produktion Zbl Bakt Hyg I Abt Org A 231,206-213 (1975)
82	LANG,N.; WERNER,H.; KRASEMANN,C.	Die Rolle der Anaerobier im Wochenbett Geburtsh Frauenheilk 40,671-677 (1980)
83	LAURELL,A.B.	Neuraminidase - like factors in cultures of pneumococci, -streptococci and pasteurella pseudotuberculosis Acta Path Microbiol Scand 47,182-186 (1959)
84	LIND,P.E.; McARTHUR,N.R.	The distribution of T-Agglutinins in human sera Aust J exp Biol med Sci 25,247-250 (1947)

85 LIS,H.; SHARON,N. The biochemistry of plant lectins
Annual Review in Biochem.42,541-573 (1973)

86 LOTAN,R. The purification, composition and specificity of the Anti-T Lectin from peanut (Arachis hypogaea)
J Biol Chem 250,8518-8523 (1975)

87 LUTHER,P.; ADAMCZYK,B.; BERGMANN,K. Nachweis von Virus-Neuraminidase und Anti-Neuraminidase durch Lectine (Lectin-Neuraminidase-Test)
Dtsch Gesundh Wes 34,1858-1862 (1979)

88 LUTHER,P.; ADAMCZYK,B.; BERGMANN,K. Simple Test for detection of virus Neuraminidase and Anti-Neuraminidase using Lectins (Lectin-Neuraminidase Test system)
Zbl Bakt Hyg Abt Org A 248,281-285 (1980)

89 MACK,R. Beitrag zum Nachweis der Erythrozyten-Antigene T_{AH}, BH_{Ee}, HL_a und A_{Db} und zu ihrer Verteilung an nativen und Neuraminidase-behandelten Erythrozyten
Diss med Göttingen (1976)

90 MAJSKY,A.; STYK,B. Studium der Anti-T-Agglutinine in aktiven und inaktiven menschlichen Seren
Z Immun Forsch 149,1-8 (1975)

91 MANTEL,W. Die Abspaltung der Neuraminsäure von Erythrozyten in Relation zur elektrophoretischen Zellbeweglichkeit
Diss med Hamburg (1968)

92 MÜLLER,H.E. Die Neuraminidase als pathogenetischer Faktor bei Pneumokokken-Infektionen
DMW 94,2149-2154 (1969)

93 MÜLLER,H.E. Die Neuraminidase als pathogenetischer Faktor bei Gasödem-Infektionen durch Clostridium perfringens
DMW 95,513-517 (1970)

94 MÜLLER,H.E. Über einen Nachweis in vitro und die Wirkung in vivo von Neuraminidase bei Clostridium septicum
Zbl Bact I Abt Org 215,530-535 (1970)

95 MÜLLER,H.E. Methodische Untersuchungen in vitro zur Einwirkung bakt. Proteasen auf menschl. Plasmaeiweißkörper, dargestellt am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa
Zbl Bakt I Abt Org 216,79-87 (1971)

96 MÜLLER,H.E. Untersuchungen über die in vivo-Wirkung von Neuraminidase bei Pasteurella multocida
Z Immun Forsch 142,31-37 (1971)

97 MÜLLER,H.E. Über das Vorkommen von Neuraminidase bei Erysipelothrix insidiosa
Path Mikrobiol 37,241-248 (1971)

98 MÜLLER,H.E. Über das Vorkommen von Neuraminidase bei Corynebacterium acnes
Z med Mikrobiol Immunol 156,240-249 (1971)

99 MÜLLER,H.E. Untersuchungen in vitro über die Neuraminidase der Pasteurella multocida
Zbl Bakt Hyg I Abt Org 217,326-344 (1971)

100 MÜLLER,H.E. Neuraminidase und Neuraminiatlyase by streptococcus sanguis
Zbl Bakt Hyg I Abt A 221,303-308 (1972)

101 MÜLLER,H.E. Neuraminidase and Acylneuraminat-Pyruvat-Lyase by Corynebacterium haemolyticum and Corynebacterium pyogenes
Zbl Bakt Hyg I Abt Org A 225,59-65 (1973)

102 MÜLLER,H.E. Die pathogenetische Bedeutung mikrobieller Neuraminidasen
DMW 99,1933-1940 (1974)

103 MÜLLER,H.E. Neuraminidases of Bacteria and Protozoa and their pathogenetic role
Behr Inst Mitt 55,34-56 (1974)

104 MÜLLER,H.E. Neuraminidase activity in streptococcus sanguis and in the viridans group and occurence of Acylneuraminatelyase in viridans organisms from patients with septicaemie
Infection and Immunity,323-328 (1974)

105 MÜLLER,H.E. Über das Vorkommen von Neuraminidase bei Sporothrix schenckii und Ceratocystis stenoceras und ihre Bedeutung für die Ökologie und den Pathomechanismus dieser Pilze
Zbl Bakt Hyg I Abt Org A 232,365-372 (1975)

106 MÜLLER,H.E. Neuraminidase als Pathogenitätsfaktor bei mikrobiellen Infektionen
Zbl Bakt Hyg I Abt Org A 235,106-110 (1976)

107	MÜLLER,H.E.; WERNER,H.	Die Neuraminidase als pathogenetischer Faktor bei einem durch Bacteroides fragilis bedingten Abszeß Z med Mikrobiol Immunol 156,98-106 (1970)
108	MÜLLER,H.E.; WERNER,H.	In vitro - Untersuchungen über das Vorkommen von Neuraminidase bei Bacteroides-Arten Path Mikrobiol 36,135-152 (1970)
109	MÜLLER,H.E.; SAATHOFF,M.	Über die pathogenetische Bedeutung von Neuraminidase bei Trichomonas foetus Zbl Bakt Hyg I Abt Org A 222,275-279 (1972)
110	MYHILL,M.K.; COOK,T.M.	Extracellular neuraminidase of Streptomyces albus Can J Microbiol 18,1007-1014 (1972)
111	NEWMANN,R.A.; UHLENBRUCK,G.	Investigation into the occurrence and structure of Lectin receptors on human and bovine erythrocytes milk fat globule and lymphocyte plasme-membrane glycoproteins Eur J Biochem 76,149-155 (1977)
112	NICOLAI,H.; ESSNER,P.; LAUER,E.	Partial purification and properties of Neuraminidase from Bifidobacterium lactentis Hoppe-Seylers Zs 362,153-162 (1981)
113	OBEID,D.; BIRD,G.W.G.; WINGHAM,J.	Prolonged erythrocyte T-polyagglutination in two children with bowel disordes J Clin Path 30,953-955 (1970)
114	PARDOE,G.L.	The inducible Neuraminidase of Klebsiella aerogenes Path Microbiol 35,361-376 (1970)
115	PEREIRA,M.E.A.; KABAT,E.A.; LOTAN,R.; SHARON,N.	Immunochemical studies an the specificity of the peanut agglutinin Carbohydrate Res 51,107-118 (1976)
116	PERRET,G.; BLADIER,D.; VASSY,R.; CORNILLOT,P.	Desialosylation of mammalian and non mammalian red blood cells: effect on in vivo survival in relation to the number of unmasked T-sites on VCV treated erythrocytes and serum T-agglutinin titers Comp Biochem Physiol Vol 69A,59-63 (1981)
117	PIPER,W.	Untersuchungen über die Wirkung der Receptor-destroying-Enzyme auf menschl. Erythrozyten Acta Haemat 18,414-428 (1957)

118	PONTOPPIDAN,H.; GEFFIN,B.; LOWENSTEIN,E.	Acute respiratory failure in the adult Little, Brown and Co Verlag, Boston (1973)
119	POSCHMANN,A.; FISCHER,K.; REUTHER,K.; MYLLYLÄ,G.	Persistent mixed field polyagglutinability Vox Sang 24,489-501 (1973)
120	POSCHMANN,A.; FISCHER,K.	Neuraminidase action in vivo: immuno-fluorescent detection of cryptantigens Behr Inst Mitt 55,129-139 (1974)
121	POSCHMANN,A.; FISCHER,K.	Hämolytisch urämisches Syndrom Med Klinik 69,1821-1834 (1974)
122	POSCHMANN,A.; FISCHER,K.; GRUNDMANN,A.; VONGJIRAD,A.	Neuraminidase-induzierte Hämolyse Ms Kinderheilk Bd 124 Hf 1,15-24 (1976)
123	POSCHMANN,A.	Blutaustauschtransfusion bei einem Säugling mit Hämolyse infolge Gasbrandinfektion 7. Bremer Bluttransfusiongespräche 30.9.1977
124	POSCHMANN,A.; FISCHER,K.	Exchange transfusion with heparinised fresh blood in necrotising enterocolitis Lancet, April 14,824-825 (1979)
125	POSCHMANN,A.; FISCHER,K.	Immunofluorescent studies in necrotising enterocolitis /NEC) Eur J Ped 130,220-225 (1979)
126	POSCHMANN,A.	Mündliche Mitteilung 1981
127	PÜPPLER,W.	Einfluß der Neuraminidase auf die Viskosität des menschl. Blutes Diss med Bonn (1976)
128	PROKOP,O.; UHLENBRUCK,G.	Lehrbuch der menschl. Blut- und Serumgruppen Thieme Verlag, Stuttgart (1966)
129	PROKOP,O.; UHLENBRUCK,G.; KÖHLER,W.	Protectine, eine neue Klasse antikörper-ähnlicher Verbindungen Dtsch Gesundh Wes 23,318-320 (1968)
130	RAU,W.	Über die Veränderung der Fließeigenschaften von menschl. Vollblut und Erythrozytensuspensionen durch Neuraminidase aus Vibrio comma Diss med Bonn (1977)
131	RAU,W.; MÜLLER,H.E.	Über die Hemmung bakt. Neuraminidasen durch verschiedene Anionen Experientia 31,515-516 (1975)

132	RICK,P.	Neuraminsäurekonzentration und Neuraminidase-aktivität in Faeces von Erwachsenen und Säuglingen Diss med Bonn (1979)
133	RODRIGUEZ-ITURBE,B.; BISHWA,M.D.; KATIYAR,N.; COELLO,Ph.D.J.	Neuraminidase activity and free sialic acid levels in the serum of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis New Engl J Med 18,1506-1510 (1981)
134	ROMANOWSKA,E.	Zur Chemie der Blutgruppensubstanzen M und N sowie deren Bezeichnung zum Influenzavirus Naturwissenschaften 49,66-66 (1960)
135	RONNEBERGER,H.	Toxicological studies with Neuraminidase Behr Inst Mitt 55,163-167 (1974)
136	SCHARMAN,W.; DRZENIEK,R.; BLOBEL,H.	Neuraminidase of Pasteurella multocida Infect Immunity 1,319-320 (1972)
137	SCHAUER,R.; VEH,R.; WEMBER,M.	Demonstration of Neuraminidase activity in human blood serum and human mild using a modified radioactively labelled α_1-glyco-protein as substrate Hoppe-Seylers Zs 357,559-566 (1976)
138	SCHMIDT,K.; STUNKAT,R.; HELLER,W.	Bestimmung der Hämolyse nach einer neuen Mikromethode bei Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine Med Welt 25,98-102 (1974)
139	SEGER,R.; JOLLER,P.; BÄRLOCHER,K.; KENNY,A.; DULAKE,C.; LEUMANN,E.; SPIERIG,M.; HITZIG,W.H.	Hemolytic-uremic syndrome associated with neuraminidase-producing microorganisms: treatment by exchange transfusion Helv Paed Acta 35,359-367 (1980)
140	SEGER,R.; JOLLER,P.; BIRD,G.W.; WINGHAM,J.; WUEST,J.; KENNY,A.; RAPP,A.; GARZONI,D.; HITZIG,W.H.; DUC,G.	Necrotising enterocolitis and neuraminidase-producing bacteria Helv Paed Acta 35,121-128 (1980)
141	SHARON,H.; LIS,H.	Lectins: Cell agglutinating and sugar-specific-proteins Science 177,Nr. 4053,949-959 (1972)
142	SHILO,M.	The breakdown of the lactose derivative by bacteria Biochem J 66,48-49 (1957)

143 SPRINGER,G.F.; ANSELL,J.N.
Inactivation of human erythrocyte agglutinogens M and N by influenza viruses and receptor destroying enzyme
Proc Nat Acad Sci 44,182-185 (1958)

144 SPRINGER,G.F.; HORTON,R.E.
Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group active bacteria
J Clin Invest 48,1280-1280 (1969)

145 SPRINGER,G.F.; DESAI,R.P.
Depression of Thomsen-Friedenreich (antiT) antibodies in humans with breast carcinoma
Naturwissenschaften 62,302-302 (1975)

146 SPRINGER,G.F.; DESAI,R.P.; SCANLON,E.F.
Blood group MN precursors as human breast carcinoma-associated antigens and naturally occurring human cytotoxins against them
Cancer 37,169-176 (1976)

147 SPRINGER,G.F.; DESAI,R.P.
Cross reacting carcinoma-associated antigens with blood group and precursor specifities
Transplant Proc 9,1105-1115 (1977)

148 SPRINGER,G.F.; DESAI,R.P.; MURTHY,M.S.;
Human carcinoma-associated precursor antigens of the MN blood group system
J Surg Oncol 11,95-106 (1979)

149 SPRINGER,G.F.; DESAI,R.P.; MURTHA,M.S.; YANG,H.J.; SCANLON,E.F.
Precursors of the blood group MN antigens as human carcinoma-associated antigens
Transfusion 19,233-249 (1979)

150 SKUTELSKY,E.; LOTAN,R.; SHARON,N.; DANON,D.
Distribution of the T-antigen on erythroid cell surfaces studies with peanut agglutinin an anti-T specific lectin
Biochem Biophys Acta 467,165-174 (1977)

151 STÄRK,J.; RONNEBERGER,H.J.; WIEGANDT,H.
Neuraminidase, a virulence factor in Vibrio Cholerae infektion?
Behr Inst Mitt 55,145-146 (1974)

152 STICKL,H.
Die Panagglutination
DMW 87, 206-210 (1962)

153 THOMSEN,O.
Ein vermehrungsfähiges Agens als Veränderer des isoagglutinatorischen Verhaltens der roten Blutkörperchen, eine bisher unbekannte Quelle der Fehlbestimmungen
Z Immun Forsch 52,85-107 (1927)

154 UHLENBRUCK,G.
Das Studium der Zelloberfläche mit Hilfe von Enzymen
Mitt Max-Planck-Gesellschaft 4,227-238 (1965)

155 UHLENBRUCK,G. Spezifität antikörperähnlicher Substanzen und die Panagglutination
Selecta 50,4099-4107 (1969)

156 UHLENBRUCK,G. Immunbiologie
Eine Einführung
Goldmann Verlag, München (1971)

157 UHLENBRUCK,G.; ISHIYAMA,J.; DIETZ,W. Nachweis von Antikörpern unter besonderer Berücksichtigung Neuraminidase-behandelter Blutzellen
Transf Immunhaem 1,48-57 (1972)

158 UHLENBRUCK,G.; PARDOE,G.J.; BIRD,G.W.G. On the specificity of Lectins with a broad agglut. spectrum
Z Immun Forsch 138,423-433 (1969)

159 UHLENBRUCK,G.; REIFENBERG,U.; PROKOP,O.; SCHNITZLER,S. Zur Diagnostik "polyagglutinabler Erythrozyten"
Acta biol med germ 26,405-409 (1971)

160 UHLENBRUCK,G.; ROTHE,A.; PARDOE,G.J. Bemerkenswerte chemische, serologische und elektrokinetische Phänomene bei Katzenerythrozyten: zugleich ein Beitrag zur Bestimmung und Deutung von mucoid- und glykolipoidgebundener Erythrozytenneuraminsäure
Z Immun Forsch 136,79-97 (1968)

161 UHLENBRUCK,G.; ROTHE Biological alterations of membrane-bound glykoproteins by neuraminidase-treatment
Behr Inst Mitt 55,177-185 (1974)

162 VAITH,P.; UHLENBRUCK,G. The Thomson agglutination phenomenon: A discovery revisited 50 years later
Z Immun Forsch 154,1-14 (1978)

163 VONGJIRAD,A. Immunofluoreszensuntersuchungen zum Nachweis der Neuraminidasewirkung an Erythrozytenmembranen und Nierenkapillaren
Diss med Hamburg (1973)

164 WARREN,L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid
J Biol Chem 234,1971-1975 (1959)

165 WARREN,L.; SPEARING,C.W. Mammalian sialidase (neuraminidase)
Biochem Biophys Res Comm 5,489-492 (1960)

166 WARREN,L.; SPEARING,C.W. Sialidase of Corynebacterium diphteriae
J Bact 86,950-951 (1963)

167 WATKINS,W.M. Enzymes of trichomonas foetus
Biochem J 71,261-265 (1959)

168 WERNER,H.; MÜLLER,H.E. Immunelektrophoretische Untersuchung über die Einwirkung von Bacteroides-Fusobacterium-Leptotrichia- und Sphaerophorus-Arten auf menschl. Plasmaproteine
Zbl Bakt I Abt Org 216,96-113 (1971)

169 WERNER,H. Infektion durch gramneg. Anaerobier
Med Klin 70,1899-1904 (1975)

170 WERNER,H.; KRASEMANN,C.; KANFLER,R.; WANDMACHER,G. Metronidazol-Empfindlichkeit von Anaerobiern
MMW 122,633-636 (1980)

L E B E N S L A U F

Am 30.03.1955 wurde ich, Ulrike Goes, als Tochter des Landrat Dr. jur. Paul Goes und seiner Ehefrau Jutta, geb. Kurz, in Stuttgart geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Stuttgart, das Gymnasium in Ludwigsburg und Göppingen; hier legte ich im Sommer 1974 am Mörike-Gymnasium die Reifeprüfung ab.

Anschließend war ich 6 Monate in der Familie des Bruders meines Vaters in Evanston/Chicago und besuchte dort an der Northwestern-University Vorlesungen in Psychologie, Mathematik und Musik.

Sodann arbeitete ich 1/2 Jahr im pflegerischen Bereich der psychiatrischen Privatklinik Dr. Landerer in Göppingen.

Vom Oktober 1975 - Oktober 1977 studierte ich Sozialpädagogik an der Universität Tübingen und erhielt im Sommer 1977 das Vordiplom.

Das Studium der Medizin begann ich im Oktober 1977 an der Universität Ulm und legte dort im August 1979 das Physikum ab.

Die klinische Ausbildung setzte ich in Tübingen fort und legte das 1. Staatsexamen im August 1980, das 2. Staatsexamen im März 1982 ab.

Von April 1983 bis Mai 1984 war ich im Rahmen des Praktischen Jahres im Städtischen Krankenhaus Esslingen/Neckar tätig und legte dort am 2.Mai 1984 das 3. Staatsexamen ab.